



Università di Pisa

*Dipartimento di Farmacia*

LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

*Molecole dual-target  
con azione pro-apoptotica:  
effetti in cellule di glioblastoma multiforme*

*Relatore:*

Dott.ssa Eleonora Da Pozzo

*Relatore:*

Dott.ssa Simona Daniele

*Candidato:*

Simone Picchi

Anno Accademico: 2013/2014

Alla mia famiglia.

A coloro che ho incontrato nella mia vita  
e che hanno fatto di me una persona migliore.

*"Se avete costruito castelli in aria,  
il vostro lavoro non deve andare perduto;  
è quello il luogo dove devono stare.  
Ora il vostro compito è di costruire  
a quei castelli le fondamenta."*

*H.D. Thoreau*



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Il Glioblastoma Multiforme . . . . .	1
1.1.1	Genetica del glioblastoma multiforme . . . . .	3
1.1.2	Terapia antitumorale specifica per il GBM . . . . .	5
1.2	La proteina p53 . . . . .	8
1.2.1	MDM2: il principale regolatore di p53 . . . . .	10
1.2.2	Vie di attivazione di p53 . . . . .	12
1.2.3	Effetti di p53: arresto del ciclo cellulare . . . . .	14
1.2.4	Effetti di p53: riparazione del DNA . . . . .	18
1.2.5	Effetti di p53: induzione dell'apoptosi . . . . .	18
1.2.6	Inibitori dell'interazione p53-MDM2 presenti in letteratura . . . . .	22
1.3	La Proteina Traslocatrice (18 kDa) (TSPO) . . . . .	24
1.3.1	Ruoli fisiologici del TSPO . . . . .	25
1.3.2	Ligandi endogeni e di sintesi al TSPO . . . . .	31
<b>2</b>	<b>Scopo della tesi</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>35</b>
3.1	Composti . . . . .	35
3.2	Linea cellulare e condizioni di coltura . . . . .	37
3.3	Studi di dissociazione del complesso p53/MDM2 . . . . .	38
3.3.1	Preparazione lisato cellulare . . . . .	38
3.3.2	Dosaggio proteico Bio-Rad . . . . .	38
3.3.3	Kit ELISA "home-made" . . . . .	39



3.4	Studi di binding competitivo su TSPO con radioligando [ <sup>3</sup> H]-PK11195 . . . . .	42
3.5	Analisi Western Blot su p53 . . . . .	45
3.5.1	Trattamento e preparazione dei lisati cellulari . . . . .	45
3.5.2	Elettroforesi delle proteine in gel di poliacrilamide con SDS (SDS-PAGE) . . . . .	45
3.5.3	Electroblotting . . . . .	46
3.5.4	Lavaggi ed incubazione . . . . .	46
3.6	Quantificazione relativa dell'espressione di geni target di p53 . . . . .	48
3.6.1	Trattamento delle cellule ed estrazione del'RNA totale . . . . .	48
3.6.2	Quantificazione dell'RNA estratto e verifica della sua qualità . . . . .	49
3.6.3	Retrotrascrizione . . . . .	49
3.6.4	Real Time PCR con <i>SybrGreen</i> . . . . .	50
3.7	Analisi della vitalità cellulare . . . . .	54
3.8	Determinazione del meccanismo di morte cellulare . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>57</b>
4.1	Dissociazione del complesso p53/MDM2 nel sistema <i>cell-free</i> . . . . .	59
4.2	Affinità di legame dei nuovi composti verso il Traslocatore proteico TSPO . . . . .	62
4.3	Stabilizzazione e riattivazione del pathway di p53 . . . . .	64
4.4	Attivazione dell'apoptosi in cellule U87MG . . . . .	67
4.5	Analisi della vitalità cellulare . . . . .	70
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>73</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>76</b>

## Sommario

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore più comune e più maligno tra le neoplasie del sistema nervoso centrale. L'aspettativa di vita per i pazienti affetti da questa patologia rimane molto bassa (circa 15 mesi dal momento della diagnosi). Il GBM acquista infatti facilmente ed in breve tempo resistenza ai trattamenti tradizionali, quali l'uso di radioterapia e agenti alchilanti del DNA. Nonostante i grandi sforzi di ricerca, gli attuali agenti chemioterapici approvati o in fase clinica avanzata offrono un quadro di scarso miglioramento prognostico.

Data la scarsità di cure efficaci contro il GBM, attualmente la ricerca si sta concentrando nell'individuazione di nuove strategie terapeutiche, quali la terapia multi-target. La carcinogenesi infatti è un processo multifattoriale e multigenico caratterizzato dalla de-regolazione di molteplici vie di segnalazione intracellulare. Un approccio farmacologico multi-target può quindi rappresentare una valida strategia per il GBM. In particolare, agenti pro-apoptotici che agiscono sul pathway di morte mitocondriale rappresentano un promettente campo di sviluppo per nuovi farmaci.

In letteratura è noto come la proteina Traslocatrice mitocondriale (TSPO) rivesta un ruolo importante nei meccanismi di morte cellulare programmata e un'aberrante espressione di tale proteina è stata evidenziata in numerosi tumori. Precedenti studi hanno dimostrato che cellule umane di GBM trattate con molecole di nuova sintesi affini al TSPO vanno incontro a morte per apoptosi. Il meccanismo proposto per tali effetti si estrinseca attraverso una probabile modulazione dell'attività del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (MPTP).

Un altro fondamentale ruolo nei meccanismi di apoptosi è svolto dalla proteina p53; oltre a promuovere l'espressione di specifici geni chiave nel controllo della proliferazione cellulare, la proteina p53 è capace di modificare direttamente la permeabilità mitocondriale, attraverso la sua interazione con proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2, e innescare il processo apoptotico in seguito a danno genotossico. Nel GBM sono stati osservati sia una mutazione del gene codificante per p53, con conseguente perdita funzionale, sia una sovraespressione della proteina

*Murine Double Minute-2* (MDM2), il principale regolatore negativo della stessa. Molecole inibitrici dell'interazione p53/MDM2 rappresentano al momento un importante approccio farmacologico per il trattamento di questa patologia. Nonostante numerosi studi abbiano identificato nel TSPO e nel complesso p53/MDM2 due validi target per il trattamento del glioblastoma multiforme, non sono state riportate in letteratura molecole in grado di interagire in modo combinato su entrambi i sistemi.

In questo lavoro di tesi è stata effettuata una valutazione biologica di molecole a struttura fenil-indol-gliosilammidica variamente sostituite, precedentemente modellizzate e sintetizzate presso i Dipartimenti di Farmacia dell'Università di Napoli Federico II e dell'Università di Pisa. In particolare è stata valutata la loro capacità di interagire con il TSPO e riattivare p53, attraverso la dissociazione dal suo inibitore MDM2. I risultati hanno mostrato che alcuni dei ligandi capaci di dissociare il complesso p53/MDM2 erano anche in grado di spiazzare il ligando classico al TSPO  $^3\text{H}$ -PK11195, durante esperimenti di radiobinding. Tali composti a duplice target sono stati saggiati per valutare la loro attività sulla trascrizione di geni pro-apoptotici e sull'attivazione delle vie di morte. In particolare, due composti, capaci di indurre circa il 70% di morte in cellule di GBM attraverso l'attivazione combinata di p53 e TSPO, si sono rivelati dei buoni composti lead per ulteriori ricerche.

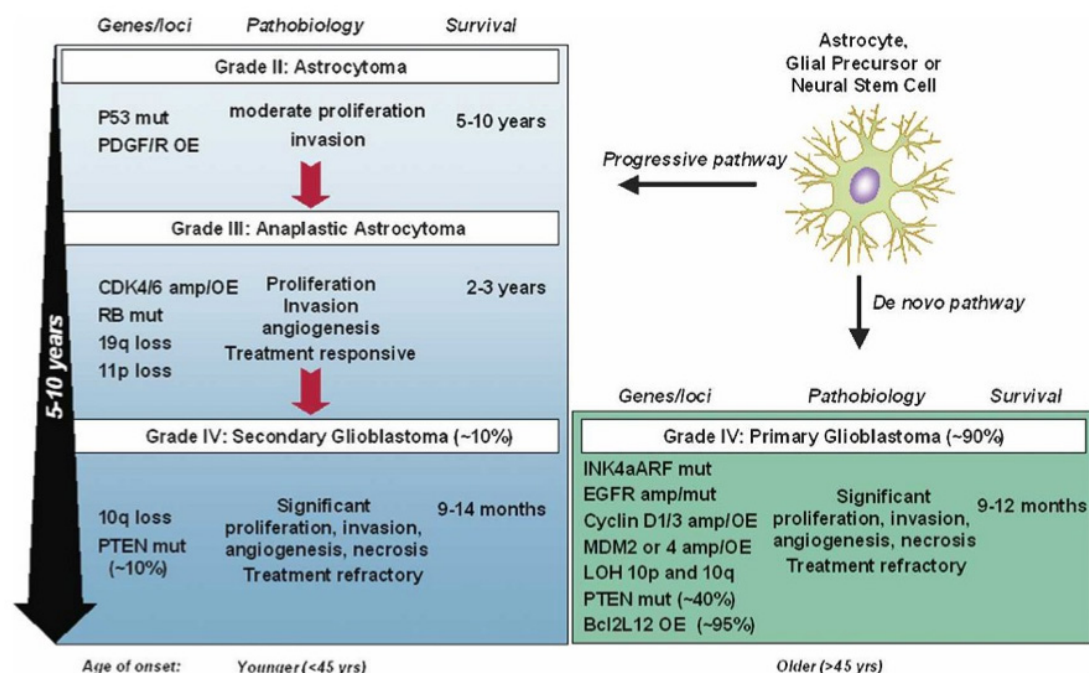
# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Il Glioblastoma Multiforme

Circa il 70% di tutti i tumori che colpiscono il Sistema Nervoso Centrale (SNC) è rappresentato dai gliomi, un gruppo di tumori cerebrali che si originano a partire da cellule della linea gliale (Van Meir et al., 2010): tali cellule, oltre a fornire supporto meccanico alle cellule neuronali in termini di nutrienti, ossigeno e smaltimento di prodotti di scarto, intervengono anche in tutti quei meccanismi di trasduzione del segnale e comunicazione con le stesse cellule neuronali a cui forniscono sostegno. Il precursore cellulare che conduce alla formazione dei gliomi è ancora sconosciuto: una delle principali teorie afferma che le cellule staminali neurali o i progenitori neurali subiscano una tipica trasformazione neoplastica durante lo sviluppo, più precisamente quando esse attraversano una fase di proliferazione transitoria; un'altra evidenza punta invece alla de-differenziazione, indotta da mutazione, di cellule mature quali oligodendrociti e astrociti (Furnari et al., 2007).

Il glioblastoma multiforme è il più comune e aggressivo tipo di tumore gliale, poiché presenta particolare tendenza all'invasività e alla proliferazione cellulare; l'incidenza è di 2-3 nuovi casi all'anno su 100.000 abitanti (Van Meir et al., 2010). La sopravvivenza media è di 14 mesi, anche a seguito di un'aggressiva asportazione chirurgica combinata con radioterapia e chemioterapia. Rari, ma presenti, sono i casi di sopravvivenza. Il tumore risulta composto da una eterogenea popolazione



**Figura 1:** Aberrazioni cromosomiali e genetiche coinvolte nella genesi del glioblastoma. Da Furnari et al. (2007).

di cellule tumorali astrocitiche scarsamente differenziate; colpisce soprattutto, ma non solo, gli adulti al di sopra dei 40 anni di età e si presenta solitamente nella materia bianca subcorticale degli emisferi cerebrali. I siti più frequentemente affetti sono il lobo temporale, il lobo parietale, il lobo frontale e il lobo occipitale. La combinazione fronto-temporale è tipica. Meno frequentemente il tumore è localizzato a livello del midollo spinale o del tronco cerebrale, ed in quest'ultimo caso riguarda più che altro i bambini. I glioblastomi intraventricolari sono eccezionali. Come tutti i tumori cerebrali, salvo rari casi, il glioblastoma non si espande oltre le strutture del SNC.

Sulla base della presentazione clinica, il GBM può essere suddiviso in tipo primario e secondario. I GBM primari per la maggior parte dei casi colpiscono pazienti anziani, mentre i GBM secondari sono più rari e tendono ad insorgere al di sotto dei 45 anni. Il GBM primario si presenta in modo acuto ed ex novo, senza alcuna evidenza di precedenti sintomi o di un antecedente tumore cerebrale a basso grado di malignità. Di contro, il GBM secondario deriva dalla progressi-

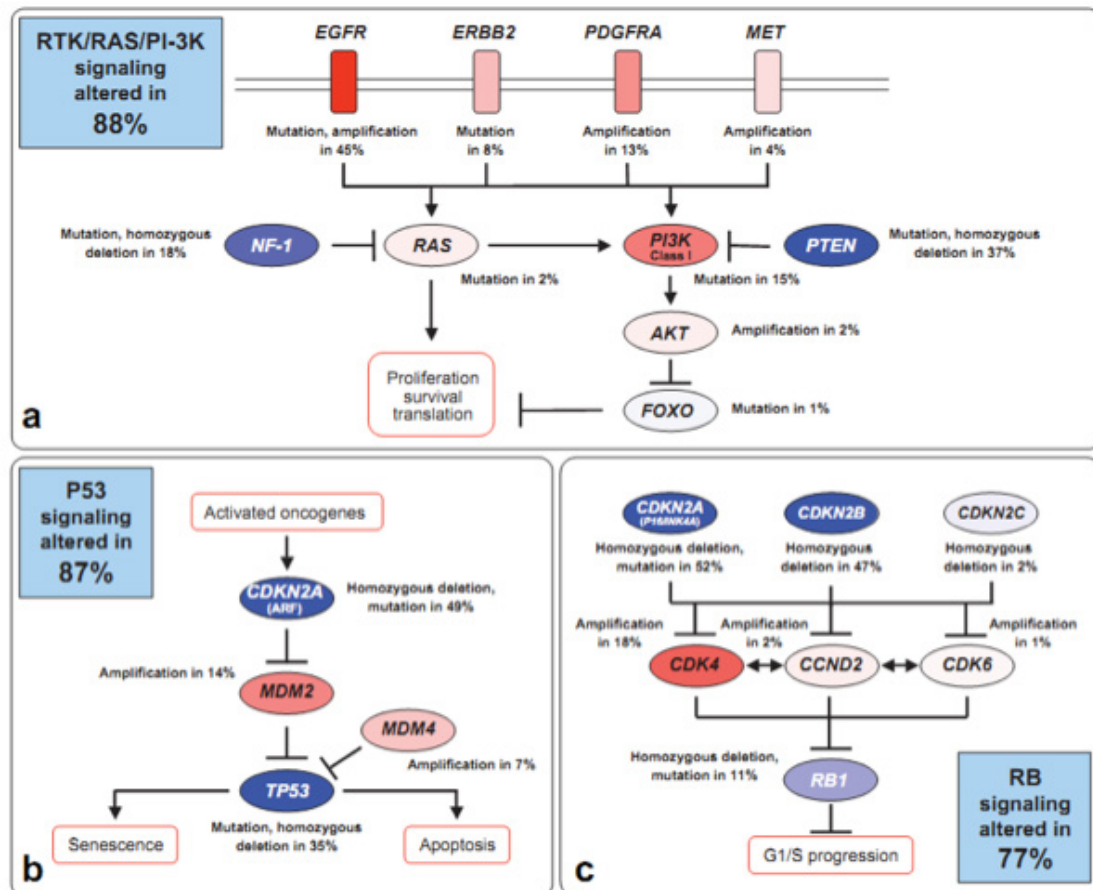
va trasformazione di un astrocitoma di basso grado (generalmente astrocitoma di grado II) in glioma di grado III/IV. Nonostante siano morfologicamente e clinicamente indistinguibili, i GBM primari e secondari sono tuttavia caratterizzati da marcate differenze a livello genomico, di *profiling* di RNA e proteine, e di risposta a chemio e radioterapia che ne riflettono la differente storia clinica (Furnari et al., 2007).

### 1.1.1 Genetica del glioblastoma multiforme

Le cellule cancerose tendono ad accumulare molteplici aberrazioni cromosomiche, mutazioni geniche ed epigenetiche, che portano alla trasformazione maligna. Questi eventi mutazionali sono stati individuati attraverso analisi genetiche molecolari e conducono tipicamente all'attivazione di oncogeni o al silenziamento dei geni soppressori del tumore. L'accumulo di alcuni danni genetici permette la sopravvivenza e la progressiva trasformazione delle popolazioni cellulari anormali, che eventualmente portano alla formazione di un tumore. Le analisi genetiche negli ultimi 30 anni hanno definito i principali geni che risultano alterati nel genoma umano e che sono associati alla formazione di tumori cerebrali. Questa analisi ha identificato una rete di mutazioni altamente interconnesse riguardanti la via di segnalazione del fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) e le pathway del fattore di trascrizione p53 e del soppressore del retinoblastoma (Rb) (Van Meir et al., 2010).

L'88% dei campioni di glioblastoma ha almeno un'alterazione nella pathway PI3K, che prevede mutazioni a livello di diversi recettori di membrana; inoltre, è frequentemente alterato l'oncosoppressore NF1 (che normalmente regola negativamente la proteina G-RAS) a livello del complesso PI3K (Masui et al., 2012). L'inattivazione della pathway del fattore di trascrizione p53 (presente nell'87% dei casi di GBM) è dovuta all'amplificazione del gene MDM2 (*Murine Double Minute 2*) che promuove la sopravvivenza della cellula e la progressione del ciclo cellulare inibendo l'oncosoppressore TP53, oltre che alla mutazione del gene stesso. Infine, per quanto riguarda la pathway del soppressore Rb, le aberrazioni più comuni riguardano i geni della famiglia delle proteine CDK (*Cyclin-Dependent Kinases*), importanti per il controllo del ciclo cellulare. La proteina Rb agisce normalmente da soppressore tumorale, poiché impedisce l'entrata della cellula nella fase S del

ciclo cellulare attraverso l'inattivazione della famiglia dei fattori di trascrizione E2F, che sono essenziali per l'inizio della replicazione del DNA.



**Figura 2:** Frequenti alterazioni genetiche in tre pathways di segnalazione cellulare. Sono mostrate le mutazioni, come anche i cambiamenti significativi nel numero delle copie geniche, per i componenti della via RTK/RAS/PI(3)K (a), p53 (b) e Rb (c). Da Van Meir et al. (2010).

L'enzima MGMT (*Methyl Guanine Methyl Transferase*) è in grado di rimuovere gli addotti derivati da agenti alchilanti (ad esempio, gruppi metilici) dalla posizione 6 dell'ossigeno della guanina, e, in grado minore, dall'ossigeno in posizione 4 della timidina, mantenendo quindi la guanina o la timina nel DNA allo stato normale. Nel glioblastoma è stato visto che la metilazione del promotore di tale gene ne determina il silenziamento e dunque la mancata espressione della

proteina. Ciò potrebbe favorire l'instabilità cromosomica indotta da certi farmaci, che si comportano come agenti alchilanti. Questo enzima, quando espresso, ripara il danno indotto dai farmaci e protegge la cellula tumorale; quando non è espresso, permette al farmaco di agire portando la cellula tumorale alla morte. Lo stato di metilazione del gene, che codifica per l'enzima MGMT, risulta dunque essere un importante marker di risposta al trattamento farmacologico con Temozolomide, un agente alchilante attualmente utilizzato nella chemioterapia per il glioblastoma. I pazienti affetti da glioblastoma, che presentano una metilazione a livello del promotore del gene MGMT, risultano essere sensibili alla Temozolomide, poiché i residui di guanina sono alchilati dal farmaco ma non vengono riparati; ciò rende le cellule cancerose maggiormente suscettibili all'evento apoptotico, portando a termine con successo la terapia. Nel caso in cui il paziente non presenti tale modificazione epigenetica non risponderà in modo adeguato al trattamento farmacologico: infatti, l'enzima verrà espresso e riuscirà a riparare i danni indotti dal farmaco alchilante, rendendo le cellule resistenti all'apoptosi e causando l'insuccesso della terapia.

In aggiunta a queste ormai ben note alterazioni, per comprendere la biologia del glioblastoma sono sempre più prese in considerazione vie di segnale come *Notch* ed *Hedgehog*, coinvolte nella regolazione dello sviluppo e del comportamento delle cellule staminali. Infatti, la biologia delle cellule staminali si sta sempre più sovrapponendo all'oncologia a causa dell'ipotesi dell'esistenza delle cellule staminali tumorali e della constatazione che geni coinvolti in diverse vie di segnale di cellule staminali giocano anche un ruolo rilevante nel cancro.

### **1.1.2 Terapia antitumorale specifica per il GBM**

In generale la terapia antitumorale specifica per il GBM prevede la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia, non necessariamente in questo ordine. Per quanto riguarda la chemioterapia, i farmaci standard per il trattamento del glioblastoma sono la Nimustina, la Carmustina e la Temozolomide: sono agenti capaci di aggiungere gruppi alchilici su specifiche basi azotate del DNA (soprattutto N7 e O6 della Guanina), comportando errori di appaiamento e rottura dei filamenti, con conseguente attivazione dei meccanismi di morte programmata.



Sono state identificate diverse variazioni epigenetiche che inducono resistenza alla chemioterapia in cellule di glioblastoma. L'enzima MGMT (*Methyl Guanine Methyl Transferase*) è in grado di rimuovere gli addotti derivati da agenti alchilanti (ad esempio, gruppi metilici) dalla posizione 6 dell'ossigeno della guanina, e, in grado minore, dall'ossigeno in posizione 4 della timidina, mantenendo quindi la guanina o la timina nel DNA allo stato normale. Nel glioblastoma è stato visto che la metilazione del promotore di tale gene ne determina il silenziamento e dunque la mancata espressione della proteina. Ciò potrebbe favorire l'instabilità cromosomica indotta da certi farmaci, che si comportano come agenti alchilanti. Questo enzima, quando espresso, ripara il danno indotto dai farmaci e protegge la cellula tumorale; quando non è espresso, permette al farmaco di agire portando la cellula tumorale alla morte. Lo stato di metilazione del gene, che codifica per l'enzima MGMT, risulta dunque essere un importante marker di risposta al trattamento farmacologico con Temozolomide, un agente alchilante attualmente utilizzato nella chemioterapia per il glioblastoma. I pazienti affetti da glioblastoma, che presentano una metilazione a livello del promotore del gene MGMT, risultano essere sensibili alla Temozolomide, poiché i residui di guanina sono alchilati dal farmaco ma non vengono riparati; ciò rende le cellule cancerose maggiormente suscettibili all'evento apoptotico, portando a termine con successo la terapia (Johannessen, 2012). Nel caso in cui il paziente non presenti tale modificazione epigenetica non risponderà in modo adeguato al trattamento farmacologico: infatti, l'enzima verrà espresso e riuscirà a riparare i danni indotti dal farmaco alchilante, rendendo le cellule resistenti all'apoptosi e causando l'insuccesso della terapia.

In aggiunta a queste ormai ben note alterazioni, per comprendere la biologia del glioblastoma sono sempre più prese in considerazione vie di segnale come *Notch* ed *Hedgehog*, coinvolte nella regolazione dello sviluppo e del comportamento delle cellule staminali. Infatti, la biologia delle cellule staminali si sta sempre più sovrapponendo all'oncologia a causa dell'ipotesi dell'esistenza delle cellule staminali tumorali e della constatazione che geni coinvolti in diverse vie di segnale di cellule staminali giocano anche un ruolo rilevante nel cancro.

Data la forte resistenza del glioblastoma alle terapie sopra menzionate e la presenza di forti effetti collaterali, la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di

nuove terapie mirate su specifici target molecolari. Lo studio comprensivo di tutte le alterazioni genetiche tipiche del glioblastoma ha permesso di creare una prima generazione di farmaci in grado di colpire specifici target cellulari e, conseguentemente, inibire determinate vie di segnale all'interno delle cellule tumorali.

Di seguito verranno brevemente riportate alcune molecole che sono in sperimentazione clinica avanzata o già approvate e utilizzate off-label nel trattamento del GBM:

- Anticorpi monoclonali: il Bevacizumab è un anticorpo monoclonale che va ad agire in senso negativo sul recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), esplicando un'azione anti-angiogenetica (Masui et al., 2012).
- Inibitori di recettori tirosin-chinasici: sono molecole che vanno ad interagire con il dominio intracellulare tirosin-chinasico del recettore, bloccandone l'azione e interrompendo a monte le diverse cascate di segnale. Esempi di questa classe di molecole sono il Gefitinib e l'Erlotinib, inibitori del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR); Imatinib, inibitore del recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR) (Kalman et al., 2013).
- Inibitori attivi sulla via PI3K/AKT/mTOR: è una via fondamentale nella regolazione del metabolismo, della crescita, della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule tumorali. Molecole che inibiscono PI3K (XL765, XL147 e BKM120) o mTOR (Temozolomide, Everolimus e Sirolimus) sono state ampiamente studiate e sono tuttora in fase di sperimentazione clinica per il GBM (Oh et al., 2014).

I risultati ottenuti dai farmaci molecolari di prima generazione sono stati deludenti a causa delle rare risposte radiografiche e della mancanza di significativi miglioramenti della sopravvivenza senza progressione della malattia. Un tentativo compiuto per migliorare questi risultati iniziali è stato quello di combinare nuove terapie molecolari con trattamenti standard, quali radiazioni e chemioterapia. Farmaci che inibiscono singoli target potrebbero anche essere combinati per ottenere

un'inibizione multipla di diversi targets. E' stato dato molto interesse alla combinazione degli inibitori di EGFR con gli inibitori di mTOR, così come a inibitori duali PI3K/mTOR.

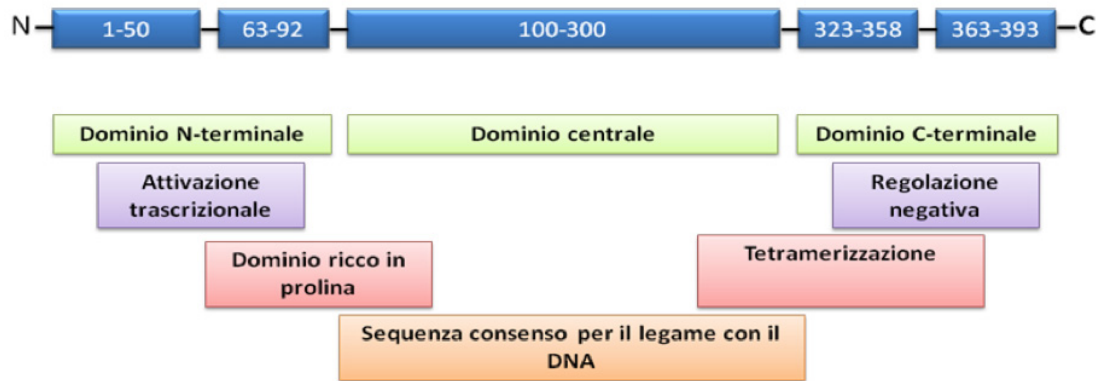
Grazie agli studi di profiling molecolare e alle analisi delle networks, si stanno scoprendo rapidamente anche geni target che potrebbero contribuire a determinare una maggiore suscettibilità delle cellule tumorali all'apoptosi. Tra i più promettenti target terapeutici ritroviamo MET (*Mesenchymal Epithelial Transition Factor*), FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), Hsp 90 (*Heat Shock Protein-90*), HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*), CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) e la proteina p53 (England et al., 2013).

## 1.2 La proteina p53

La proteina p53 è un fattore di trascrizione nucleare coinvolto in importanti funzioni cellulari come la trascrizione, la sintesi e la riparazione del DNA, l'arresto del ciclo cellulare, l'invecchiamento e l'apoptosi. La caratteristica che accomuna tutte le cellule tumorali consiste nella deregolazione della proliferazione cellulare con la conseguente perdita della capacità di andare incontro ad apoptosi. In questo contesto è fondamentale il ruolo svolto dalla proteina p53 sia nel mantenimento dell'integrità genomica, sia nella soppressione della genesi tumorale.

Il gene umano che codifica per p53 (TP53) è situato a livello del braccio corto del cromosoma 17 e la sua trascrizione è indotta dalla stessa p53. La proteina tradotta è costituita da 393 amminoacidi (peso complessivo di 53 kDa) divisi strutturalmente e funzionalmente in diversi domini (Figura 3):

- I primi 42 amminoacidi della N-terminale costituiscono un dominio di transattivazione (TAD) necessario per l'induzione all'espressione di geni bersaglio.
- La regione centrale (amminoacidi 102-292), denominata BDB (dominio di legame al DNA), presenta dei domini *zinc-finger* con residui di istidina e cisteina coordinati allo zinco; in aggiunta sono presenti residui di arginina che favoriscono l'interazione elettrostatica tra la proteina e l'acido nucleico.



**Figura 3:** Struttura schematica dei domini di p53

- Un dominio di tetramerizzazione (amminoacidi 324-353); la p53 nativa è infatti costituita, in soluzione, da un tetramero e soltanto in questa forma può agire come oncosoppressore.
- I 26 amminoacidi della porzione C-terminale (denominata CTD, dominio carbossi terminale) costituiscono una regione di regolazione allosterica per il legame della proteina a specifiche sequenze di DNA attraverso il suo dominio centrale.
- Sono presenti inoltre un sito di localizzazione nucleare (NLS, amminoacidi 300-323), un sito di esporto nucleare (NES, situato tra il dominio di tetramerizzazione e la regione carbossi-terminale) e un dominio ricco in proline che interagisce con SIN3, una proteina inibente la degradazione di p53.

In condizioni fisiologiche i livelli di p53 sono mantenuti bassi grazie ad una rapida degradazione. L'attivazione di p53 avviene in risposta a molteplici segnali di stress cellulare, tra cui:

- Danni al DNA: radiazioni, alchilazione di basi azotate, reazioni radicaliche.
- Deprivazione di fattori di crescita.
- Ipossia/anossia

- Shock termici che conducono ad aggregazione dell'RNA e denaturazione proteica.
- Agenti citotossici.

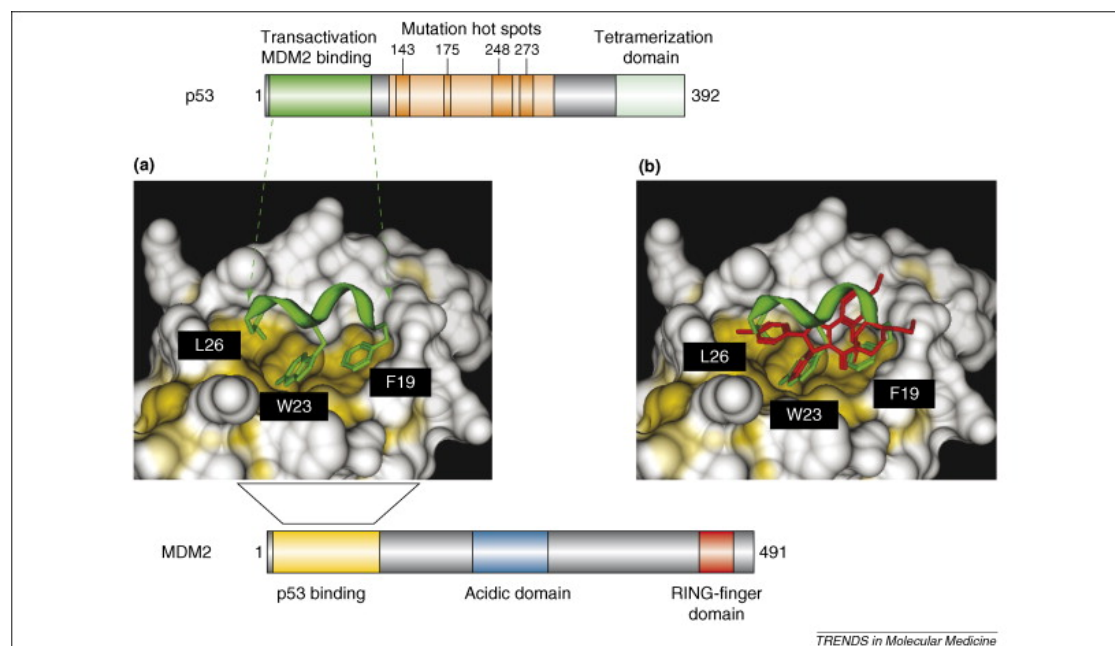
In seguito ad attivazione, operata da specifiche chinasi o acetilasi, p53 può entrare nel nucleo grazie alla sua sequenza NLS che lega le proteine Importina  $\alpha$  e  $\beta$ , le quali mediano l'interazione con il complesso costituente il poro nucleare. Una volta all'interno del nucleo p53 lega specifiche sequenze di DNA, denominate *p53-responsive elements*, promuovendo la trascrizione di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare (come p21), nella riparazione del danno genotossico (53BP1, DDB2, XPC) e in ultimo nei processi di apoptosi (PUMA). L'uscita dal nucleo è regolata dall'interazione della sequenza NES, ricca in leucina, con la proteina Esportina 1 (Liang and Clarke, 2001).

Si è ipotizzato che l'oligomerizzazione di p53 possa regolare il suo traffico nucleocitoplasmatico modificando l'accessibilità delle sequenze NLS e NES alle rispettive proteine mediatrici: è stato osservato infatti che mutazioni a carico dei residui fondamentali per la tetramerizzazione, ma non per l'uscita dal nucleo, incrementano l'efficienza di ingresso nucleare e ciò suggerisce che il monomero entri nel nucleo con maggiore efficienza rispetto all'oligomero. Questa osservazione può essere spiegata da un mascheramento delle sequenze NLS e NES nella forma oligomerizzata che non vengono così riconosciute dalle specifiche proteine carrier; si osserva quindi un passaggio da tetramero a monomero qualora sia necessario il passaggio attraverso la membrana nucleare (Vousden and Ryan, 2009).

### 1.2.1 MDM2: il principale regolatore di p53

Come precedentemente accennato, la proteina p53 ha un'emivita molto breve (5-20 minuti) ed è presente nel citoplasma a basse concentrazioni a causa della sua continua disattivazione e degradazione, mediata principalmente dalla proteina *Murine Double Minute 2* (MDM2). Questa fosfoproteina risulta costituita da 491 amminoacidi per un peso complessivo di 56 kDa e contiene domini strutturali altamente conservati: la porzione N-terminale forma una tasca idrofobica capace di accogliere un'  $\alpha$ -elica presente a livello del dominio di transattivazione TAD di

p-53; in particolare è stato osservato che per l'interazione con MDM2 sono fondamentali tre residui di p53 (Phe19, Trp23, Leu26)(Ma and Nussinov, 2007). Un dominio centrale acido (a.a. 230-300) è risultato fondamentale per la regolazione di MDM2, in quanto sede di fosforilazioni e contenente segnali per la localizzazione intracellulare. Un dominio RING (C-terminale) è capace di coordinare due atomi di zinco, fondamentali per il corretto ripiegamento tridimensionale del dominio stesso: esso conferisce l'attività ubiquitina-ligasica (E3) promuovendo la degradazione via proteasoma di p53 (Figura 4).



**Figura 4:** Struttura di MDM2 e sua interazione con p53. Da Vassilev (2007).

MDM2 inibisce l'attività trascrizionale di p53 in diversi modi:

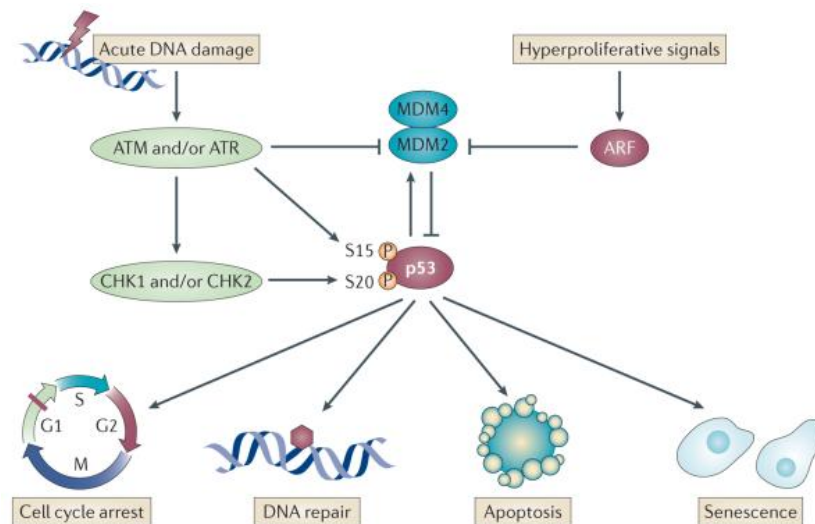
- Può legarsi al dominio TAD inibendo l'attività trascrizionale di p53.
- Porta alla degradazione di p53 all'interno del proteasoma attraverso l'ubiquitinazione di residui lisinici in corrispondenza della regione carbossi-terminale.
- Favorisce l'uscita di p53 dal nucleo tramite l'interazione con il sito di esportazione nucleare.

La trascrizione del gene Mdm2 è regolata dalla stessa p53 che agisce quindi nella propria regolazione tramite un feedback negativo volto a regolare il livello cellulare di p53 in condizioni fisiologiche. Modifiche post-traduzionali di p53 diminuiscono la sua affinità per MDM2 e portano ad un aumento della sua emivita di alcune ore e ad un aumento della sua concentrazione intracellulare di 3-10 volte.

È stato osservato che al complesso p53-MDM2 prende parte anche una terza proteina, MDMX (altrimenti nota come MDM4), che coopera con MDM2 nell'inattivazione di p53; MDMX non possiede attività ubiquitina-ligasica, ma agisce attraverso due meccanismi: con la porzione NH-terminale si lega strettamente al dominio TAD di p53 inibendo la sua attività trascrizionale; mediante il dominio RING (carbossi-terminale) interagisce con MDM2 stabilizzandolo e promuovendo la sua attività E3 ligasica. In assenza di MDMX, MDM2 presenta un'emivita breve che lo rende poco efficiente nella down-regulation di p53 (Vassilev et al., 2012).

### 1.2.2 Vie di attivazione di p53

L'attivazione di p53 è dipendente dalla sua stabilizzazione. Questa è favorita sia da modifiche post-traduzionali che aumentano l'emivita di p53 che dall'inibizione del suo principale modulatore negativo, MDM2.



**Figura 5:** Alcune vie di attivazione del pathway di p53.

In caso di danno al DNA si ha attivazione di diverse chinasi ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*), MAPK (*p38 mitogen-activated kinase*), DNA-PK (*DNA dependent protein kinase*) e CDK1 e CDK2 (Chinasi ciclina-dipendenti) che fosforilano p53 a livello dei residui Ser 15 e Ser 20 riducendone l'affinità per MDM2. Un'ulteriore proteina chinasi è ATM (*Ataxia telangiectasia mutated kinase*) che riconosce il DNA danneggiato e fosforila p53 a livello del residuo Thr18, riducendo la sua affinità per MDM2 ed aumentando la sua attività trascrizionale. Allo stesso tempo fosforila MDM2 diminuendo la sua capacità di indurre la degradazione di p53. Sempre in caso di danno, p53 può essere acetilata a livello di specifici residui di lisina (in posizione 370, 371, 372, 381 e 382) situati nella regione carbossi-terminale, ad opera di CBP/p300, una proteina che possiede attività acetil-transferasica (HAT) e, in misura minore, dal fattore associato a CBP/p300 (PCAF) a livello del residuo Lys320. L'acetilazione dei residui lisinici ne impedisce l'ubiquitinazione da parte di MDM2 con conseguente aumento dell'emivita di p53. Inoltre l'acetilazione migliora l'interazione con gli stessi CBP/p300 e PCAF, potenziatori dell'attività trascrizionale di p53. Un controllo negativo del processo è dato da MDM2 che è capace di interagire con la deacetilasi HDAC1: le due proteine agiscono in modo sinergico formando un complesso indispensabile per la deacetilazione di p53 (Arora et al., 2013).

L'espressione di oncogeni, come Ras Myc può stimolare la sintesi di ARF, una proteina nucleolare che si lega a MDM2 a livello della porzione che possiede attività ubiquitino-ligasica, sequestrandolo all'interno del nucleolo e impedendogli di legarsi a p53. In modo simile ad ARF, la proteina ribosomiale L11 può interagire con MDM2 e inibirla, attivando p53 (Dai et al., 2012).

Un'ulteriore via di attivazione di p53 coinvolge la defosforilazione dell'inositolo trifosfato (IP3). Quest'ultimo è un mediatore che recluta proteine che contengono il dominio PH (*pleckstrin-homology-domain*) come AKT e le chinasi attivatrici di AKT (PDK). AKT fosforila specifiche proteine che promuovono la sopravvivenza cellulare. La traslocazione di MDM2 all'interno del nucleo è dipendente dalla sua fosforilazione da parte di AKT (a livello dei residui Ser166 e Ser186). Una volta traslocato nel nucleo, MDM2 causa l'ubiquitinazione di p53 e la sua degradazione



all'interno del proteasoma. La proteina PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) è la principale antagonista della via mediata da AKT: la sua azione consiste nel defosforilare il fosfatidilinositolo-3-fosfato confinando MDM2 nel citoplasma dove viene degradato. Inoltre p53 induce la trascrizione di PTEN legandosi al promotore del gene codificante. L'integrità del sito di legame è molto importante per l'innescare del pathway apoptotico. In condizioni di stress cellulare infatti p53 induce prima la trascrizione di MDM2 consentendo alla cellula di riparare il DNA e altri eventuali danni; se questo non avviene, l'induzione di PTEN scavalca i segnali di sopravvivenza e induce la morte cellulare (Vassilev et al., 2012).

Altre due proteine risultano importanti nell'attivazione di p53: HAUSP (*Herpes virus associated ubiquitin-specific protease*) e la proteina nucleare c-Abl. HAUSP è un antagonista funzionale di MDM2 che agisce rimuovendo le molecole di ubiquitina legate a p53, quando stimolato da danni al DNA, proteggendo quindi p53 dalla degradazione mediata da MDM2. La proteina c-Abl presenta attività tirosin-chinasica e, in caso di danno al DNA, si lega a p53 aumentandone l'attività trascrizionale. L'interazione avviene tra il dominio SH3 (Src homology domain 3) di c-Abl e il dominio ricco di proline di p53. La delezione di quest'ultimo dominio, che porta ad una forma mutata di p53, non influisce sull'attività trascrizionale della proteina ma riduce significativamente l'abilità di p53 mutata di indurre apoptosi e blocco del ciclo cellulare (Vassilev et al., 2012).

### 1.2.3 Effetti di p53: arresto del ciclo cellulare

La progressione del ciclo cellulare è finemente controllata ed è mediata da una famiglia di proteine denominate chinasi ciclina-dipendenti (CDK). Sono costituite da una subunità catalitica e una subunità di regolazione positiva a cui si lega la ciclina, senza la quale l'attività chinasica risulta notevolmente ridotta. Diversi aspetti del ciclo cellulare richiedono una regolazione negativa delle CDK, che viene operata attraverso la fosforilazione della subunità catalitica da parte di proteine denominate inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI). Sono state descritte due famiglie di CKI: i membri della famiglia INK4 sono specifici per le chinasi CDK4 e CDK6 mentre quelli appartenenti alla famiglia Cip/Kip agiscono su uno spettro più ampio di CDK. Uno dei membri più importanti della famiglia Cip/Kip

è p21.

Il controllo del ciclo cellulare avviene a livello dei checkpoint, punti di controllo indispensabili per assicurare che cromosomi incompleti o danneggiati non siano replicati e trasmessi alle cellule figlie. I più importanti sono quattro:

- Un primo checkpoint in fase  $G_1$  tardiva blocca il ciclo cellulare in caso di assenza di fattori di crescita ed arresta le cellule in fase  $G_0$  (quiescenza). Inoltre il blocco in  $G_1$  si verifica anche nel caso in cui si abbiano danni al DNA per permettere di riparare il danno prima che la cellula entri in fase S, dove l'acido nucleico danneggiato sarebbe altrimenti replicato.
- Un secondo checkpoint in fase S garantisce il continuo monitoraggio dell'integrità del DNA per assicurare che il DNA danneggiato sia stato riparato prima di essere replicato.
- Un terzo checkpoint in fase  $G_2$  tardiva blocca l'inizio della mitosi fino al completamento della duplicazione del DNA. In presenza di DNA non duplicato o danneggiato si ha blocco del ciclo cellulare finché non sia stato replicato tutto il DNA, riparato il danno o attivati i meccanismi apoptotici.
- Un ultimo checkpoint in fase M tardiva è definito "punto di controllo del fuso" e regola l'allineamento dei cromosomi sul fuso mitotico assicurando che venga distribuito accuratamente alle cellule figlie un corredo cromosomico completo.

#### *Blocco in $G_1$*

Il fattore di trascrizione E2F è coinvolto nell'attivazione di una serie di geni richiesti per iniziare o prolungare la fase S del ciclo cellulare. Generalmente è legato alla proteina del riboblastoma (Rb), che ne inibisce l'attività. La fosforilazione di Rb, iniziata dalle chinasi CDK4/6-ciclina D e completata dalla chinasi CDK-ciclina E, consente di rilasciare il fattore E2F, attivandone l'attività trascrizionale.

Il principale controllo negativo del processo è dato da p21, uno dei principali prodotti di trascrizione di p53. Il trasferimento di p21 dal citosol al nucleo è favorito dalla proteina PTEN e comporta il blocco del ciclo cellulare in fase  $G_1$ . Al contrario la via regolata da PI-3K e AKT previene l'entrata di p21 nel nucleo

favorendo la replicazione cellulare in risposta a fattori di crescita. Il legame di due molecole di p21 al complesso CDK-ciclina E ne inibisce l'attività chinastica e la mancata fosforilazione di Rb blocca la progressione del ciclo cellulare. Contemporaneamente p21 si lega al dominio carbossi-terminale dell'antigene nucleare delle cellule in proliferazione (PCNA) bloccando la sua attività quale fattore di processività per la DNA-polimerasi  $\delta$  nella replicazione ma non nella funzione riparatrice del DNA. Il risultato finale è un blocco in G1 del ciclo cellulare che permette di riparare il danno prima dell'inizio della replicazione del DNA. Nel caso in cui ciò non avvenga p53 innesca il pathway dell'apoptosi cellulare.

p21 presenta anche un ruolo fondamentale nella senescenza cellulare, ovvero il blocco irreversibile del ciclo cellulare. In molte linee cellulari tumorali umane trattamenti volti alla sovraespressione di p21 portano all'arresto del ciclo cellulare (in fase G1 e G2 principalmente) e alla comparsa di marcatori cellulari di senescenza come la  $\beta$ -Galattosidasi (SA- $\beta$ -Gal), una idrolasi che catalizza l'idrolisi di  $\beta$ -galattosidi in monosaccaridi. È stata inoltre osservata l'acquisizione di una morfologia allargata e appiattita tipica delle cellule senescenti e assenza di divisione cellulare. Infine, nella fase primaria della senescenza indotta da p21, si è visto essere compromessa l'attività della telomerasi con conseguente accorciamento dei telomeri (Romanov et al., 2012).

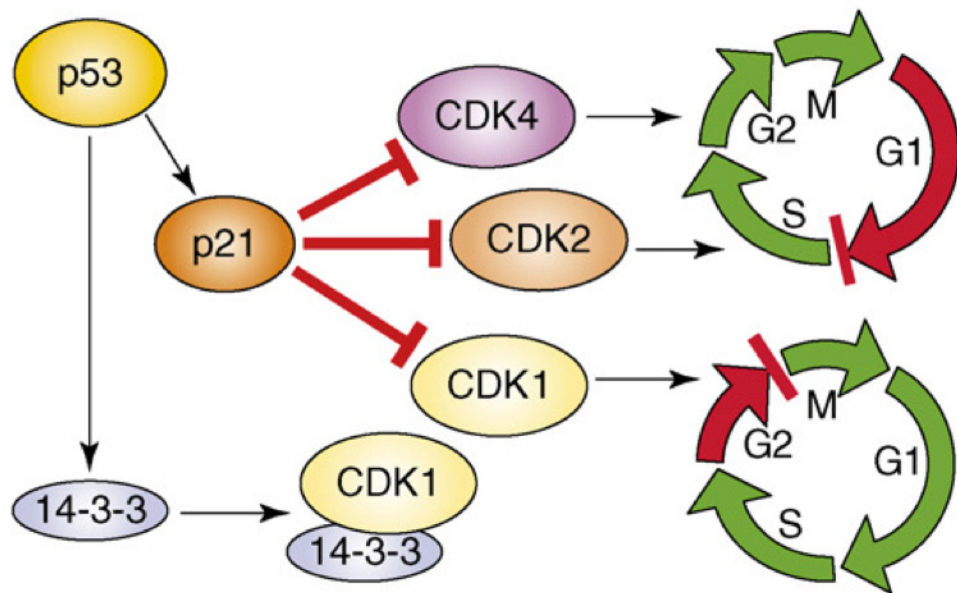
### *Blocco in G<sub>2</sub>/M*

La chinasi Cdc2 è una proteina fondamentale per l'entrata della cellula in mitosi. La sua attivazione è dipendente dal legame con la ciclina B1 e dalla fosforilazione del residuo Thr161 da parte di una *CDK-activating kinase* (CAK). Durante la fase G<sub>2</sub> il complesso Cdc2/Ciclina B1 è mantenuto inattivo tramite la fosforilazione dei residui Tyr15 e Thr14 di Cdc2 da parte delle chinasi Wee1 e Myt1, rispettivamente. Subito prima della mitosi entrambi i residui sono defosforilati ad opera della fosfatasi Cdc25. Successivamente il complesso Cdc2/Ciclina B1 fosforila Cdc25, evento importante per l'inizio della mitosi.

Diversi prodotti di trascrizione indotti da p53 possono inibire Cdc2, come p21, Gaad45 o la proteina 14-3-3  $\sigma$ . p21 inibisce Cdc2 in modo diretto, mentre la proteina 14-3-3  $\sigma$  si lega al complesso Cdc2/Ciclina B1 confinandolo nel citoplasma, dove non può indurre la mitosi. Gadd45 induce invece la dissociazione di Cdc2

dalla Ciclina B1. Inoltre p53 agisce come regolatore negativo della trascrizione del gene codificante per la Topoisomerasi II, enzima fondamentale nel controllo del grado di superavvolgimento del DNA.

Un meccanismo di blocco in G<sub>2</sub> indipendente da p53 coinvolge le chinasi attivate in seguito a danno al DNA, tra cui ATM e ATR, le quali fosforilano e attivano le serina chinasi Chk1 e Chk2. Quest'ultime fosforilano Cdc25, creando un sito di legame per la proteina 14-3-3  $\sigma$  che sequestra Cdc25 nel citoplasma, dove non è in grado di fosforilare il complesso Cdc2/Ciclina B1. Inoltre ATM e ATR incrementano la fosforilazione dei residui Tyr15 e Thr14 di Cdc2, favorendone lo stato inattivo.



**Figura 6:** Effetti di p53 sul ciclo cellulare. Da Liang and Clarke (2001).

### 1.2.4 Effetti di p53: riparazione del DNA

La proteina p53 riveste un ruolo essenziale nella riparazione del danno del DNA. Tra le varie tipologie di riparazione dell'acido nucleico figurano:

- Riparazione del danno su singolo filamento: riparazione per escissione di base (BER); riparazione per escissione di nucleotidi (NER) e *Mismatch Repair* (MMR).
- Riparazione del danno su entrambi i filamenti: ricombinazione omologa (HR).

p53 è in grado di regolare le proteine coinvolte nella riparazione dell'acido nucleico. In particolare:

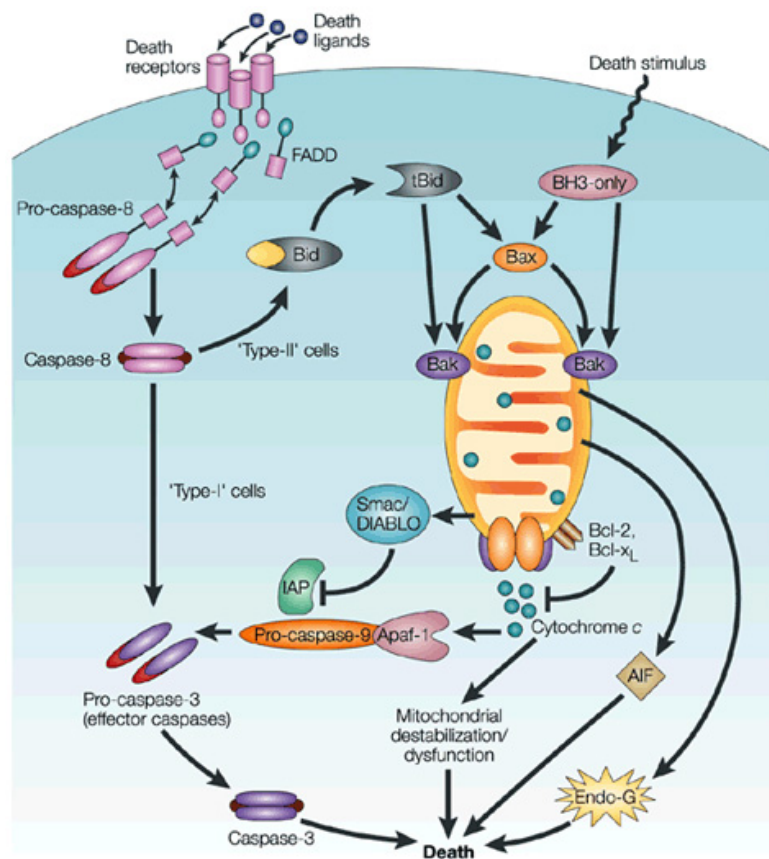
- Lega e modula l'attività delle elicasi associate alla NER, XPB e XPD.
- Regola l'espressione di DDB2 (*damage-specific DNA binding protein 2*) e XPC (*Xeroderma pigmentosum complementation group C*), due proteine che svolgono un ruolo importante nelle fasi precoci della NER, tra cui il riconoscimento del DNA danneggiato e il legame all'acido nucleico.
- Agisce da fattore di accessibilità alla cromatina.
- Si lega a RAD51 e RAD54, i maggiori interpreti del meccanismo HR.

Le elicasi a cui si lega p53 sono subunità del fattore di trascrizione IIH (TFIIH). Tale fattore è coinvolto sia nella trascrizione mediata dalla RNA polimerasi II che nella riparazione del DNA danneggiato. TFIIH possiede azione elicasica e ATP chinasi ed è stato recentemente dimostrato che cellule prive delle due elicasi che costituiscono le subunità di TFIIH (XPB e XPD) non sono in grado di andare incontro ad apoptosi mediata da p53.

### 1.2.5 Effetti di p53: induzione dell'apoptosi

Nel caso in cui il danno genotossico sia irreparabile p53 può condurre la cellula all'apoptosi mediante due vie: la via estrinseca e quella intrinseca. La via

estrinseca coinvolge particolari recettori di morte che fanno parte della famiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF-R) e, attraverso la formazione del complesso di morte DISC, porta a una cascata di attivazione delle caspasi, incluse la caspasi-8 e la caspasi-3, che inducono l'apoptosi. La via intrinseca è invece associata alla depolarizzazione mitocondriale e al rilascio di citocromo C dallo spazio intermembrana al citoplasma. Successivamente il citocromo C, il fattore apoptotico proteasi-attivante APAF-1 e la procaspasi-9 formano un complesso denominato apoptosoma all'interno del quale la caspasi-9 viene attivata e promuove l'attivazione delle caspasi 3, 6 e 7.



**Figura 7:** Vie di attivazione del processo apoptotico. (Da [www.nature.com](http://www.nature.com))

*Via estrinseca.* p53 può attivare la via estrinseca attraverso l'induzione di geni

codificanti per tre proteine transmembrana: Fas, DR5 e PERP.

- Fas fa parte della famiglia TNF-R ed è attivata dal suo ligando FasL. In seguito ad attivazione, due o tre molecole di Fas si aggregano formando un sito di legame per una proteina adattatrice FADD (*Fas-associated death domain*) che va ad attivare la cascata delle caspasi a partire dalla procaspasi-8.
- DR5 è attivato dal suo ligando, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) e promuove l'apoptosi attraverso l'attivazione della caspasi-8.
- PERP è un gene target di p53 indotto specificatamente durante l'apoptosi ma non durante l'arresto del ciclo cellulare. Recentemente è stato dimostrato che elevati livelli di PERP influenzano positivamente i livelli del suo regolatore trascrizionale p53 (Davies et al., 2011).

*Via intrinseca.* La via intrinseca è governata dalle proteine della famiglia Bcl-2 che controllano il rilascio del citocromo C dal mitocondrio. La caratteristica strutturale di queste proteine è la presenza dei domini di omologia di Bcl-2 (BH). I membri proapoptotici si dividono in due sottoclassi:

- Membri che contengono i domini BH1, BH2 e BH3: Bak (*Bcl-2 antagonist / killer-1*) e Bax (*Bcl-2-associated X protein*). Bax si può trovare sotto forma di monomero a livello citoplasmatico o debolmente legato alla membrana esterna mitocondriale quando è inattivo, mentre Bak è costantemente legato alla membrana mitocondriale esterna.
- Membri contenenti solo il dominio BH3:
  - Attivatori (tBid e Bim): stimolano l'oligomerizzazione di Bak e Bax.
  - Depressori (PUMA, Noxa e Bad): inibiscono i membri antiapoptotici della famiglia Bcl-2, promuovendo il meccanismo di morte programmata (Zuckerman et al., 2009).

All'interno della famiglia Bcl-2 si collocano anche proteine anti-apoptotiche come Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia-1*) contenenti domini BH1, BH2, BH3 e BH4. La loro funzione è quella di formare complessi con Bak e Bax impedendone l'oligomerizzazione o inibendo le proteine pro-apoptotiche che contengono solo il

dominio BH3. In seguito ad attivazione, Bax e Bak si inseriscono nella membrana mitocondriale esterna e oligomerizzano per formare dei pori lipidici dinamici che provocano il rilascio dallo spazio intermembrana nel citoplasma di proteine che promuovono la morte cellulare, tra cui SMAC (*Second mitochondria-derived activator of caspase*) e il citocromo C. Successivamente si ha la formazione dell'apoptosoma come descritto in precedenza.

In caso di stress cellulare, p53 trasloca dal nucleo al citoplasma e al mitocondrio dove blocca i fattori antiapoptotici Bcl-2 e Bcl-xL attraverso interazioni di tipo elettrostatico. Le interazioni si instaurano tra la regione caricata positivamente di p53, corrispondente ai residui 239-248 del dominio centrale e le cariche negative di Bcl-xL/Bcl-2 situate a livello del dominio BH4. Il legame con p53 inattiva e inibisce la formazione di loro complessi con Bak e Bax. La traslocazione di p53 a livello mitocondriale dipende dalla sua mono-ubiquitinazione da parte di MDM2. Subito dopo l'entrata nel mitocondrio p53 subisce una rapida de-ubiquitinazione ad opera della proteasi HAUSP.

p53 interagisce anche direttamente con Bak liberandolo dai complessi inibitori preesistenti con la proteina Mcl-1. L'affinità di p53 per Bcl-xL/Bcl-2 è dieci volte maggiore rispetto a quella per Bak (160 nM contro 16  $\mu$ M), probabilmente perché Bak non possiede un'interfaccia acida data dalla presenza del dominio BH4. p53 favorisce quindi l'oligomerizzazione di Bak e Bax, provocando un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*).

In aggiunta al meccanismo mitocondriale si ha un secondo meccanismo. In risposta ad uno stress p53 attiva la trascrizione del gene che codifica per PUMA, una proteina che interagisce con Bcl-xL, liberando p53 dal complesso citosolico p53/Bcl-xL. p53 libera è così in grado di attivare direttamente Bax/Bak nel citosol. Inoltre p53 induce l'espressione di altri geni fondamentali per l'induzione dell'apoptosi quali Noxa, Bcl-2 e Bid (Zuckerman et al., 2009).



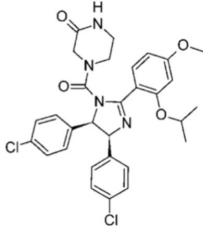
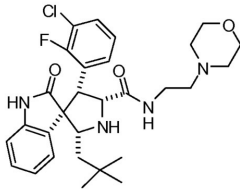
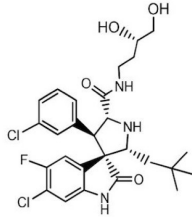
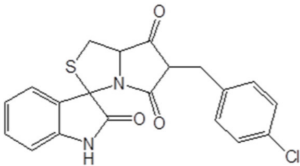
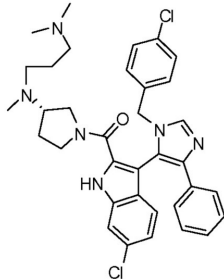
### 1.2.6 Inibitori dell'interazione p53-MDM2 presenti in letteratura

Come precedentemente riportato, in un'alta percentuale di casi di GBM risulta amplificata l'espressione delle proteine regolatrici MDM2 e MDMX. Il ripristino della funzione alterata di p53, interrompendo l'interazione p53-MDM2 o p53-MDMX, rappresenta quindi un promettente approccio alternativo all'attuale chemioterapia genotossica.

Gli inibitori di MDM2 sono piccole molecole progettate per imitare la breve  $\alpha$ -elica costituita dal dominio N-terminale di p53, in modo da inserirsi nella piccola tasca idrofobica di MDM2 e competere con p53 per l'interazione con essa. Le prime molecole sintetizzate sono state le Nutline, composti che presentano un nucleo cis-imidazolinico. All'interno di questa classe la molecola che ha evidenziato la maggiore capacità inibitoria per l'interazione p53-MDM2 è stata Nutlina-3: essa presenta una struttura cis-4,5-diidroimidazolica a cui sono legati quattro sostituenti. I due sostituenti para-clorofenilici di Nutlina-3 si inseriscono nelle tasche lipofile che accolgono i residui Trp23 e Leu26 di p53, mentre il terzo sostituito fenolico interagisce con la cavità occupata dal residuo Phe19 grazie al gruppo orto-isopropilico. Il sostituito piperazinico invece non interagisce direttamente con i siti di interazione propri di p53. Esperimenti condotti in vitro hanno dimostrato come Nutlina-3 induca arresto del ciclo cellulare e apoptosi mediati da p53; i risultati ottenuti hanno mostrato un incremento dose-dipendente di p53 con un massimo alla concentrazione di 10  $\mu$ M in cellule di glioblastoma multiforme umano.

MI-219 e MI-63 sono stati i primi inibitori di MDM2 sintetizzati ad avere un nucleo spiro-ossindolico. L'inibitore più potente di questa classe, nominato MI-63, è altamente efficace nell'attivazione di p53 e nell'inibizione della crescita di cellule di vari tipi di tumore con p53 *wild-type*, mostrando un'elevata stereospecificità nel bloccare l'interazione tra MDM2 e p53.

Nella Tabella 1 sono riportati alcune delle molecole presenti in letterature che si sono dimostrate attive nell'inibizione di MDM2 e nella riattivazione del *pathway* di p53.

MOLECOLA	DENOMINAZIONE STRUTTURALE	STRUTTURA	$IC_{50}/K_i$ MDM2
Nutlina 3	Cis-imidazolina		$K_i = 36 \text{ nM}$ $IC_{50} = 90 \text{ nM}$
MI-63	Spiro-Ossindolo		$K_i = 3 \text{ nM}$
MI-219	Spiro-Ossindolo		$K_i = 5 \text{ nM}$
ISA27	Spiro-Ossindolpirrolidina		$IC_{50} = 165 \text{ nM}$
WK298	Imidazolo-Indolo		$K_i = 109 \text{ nM}$

**Figura 8:** Alcuni inibitori di MDM2 presenti in letteratura. Da Popowicz et al. (2011); Costa et al. (2013).

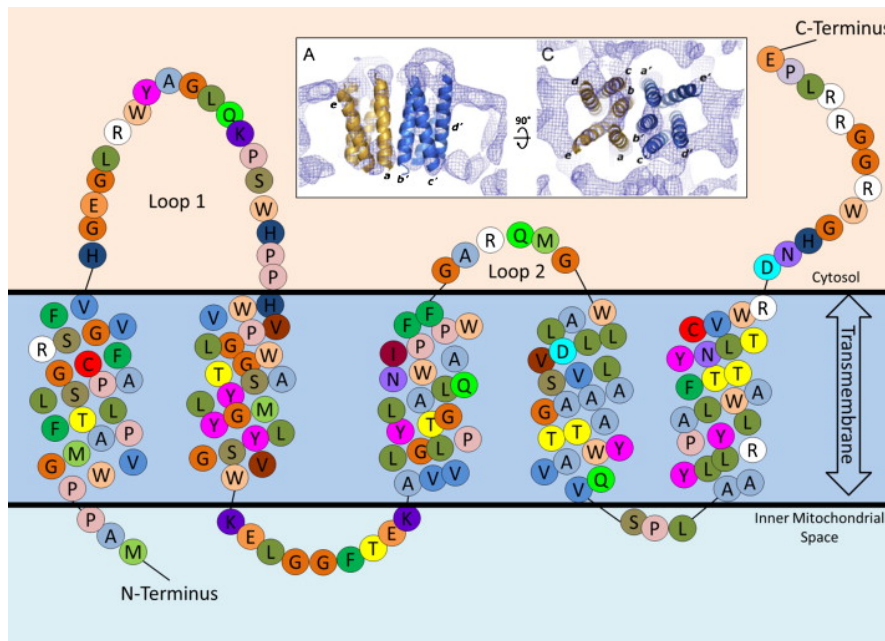
## 1.3 La Proteina Traslocatrice (18 kDa) (TSPO)

Il Traslocatore Proteico (TSPO), precedentemente conosciuto con il nome di recettore periferico delle benzodiazepine (PBR), è stato identificato per la prima volta nel 1977 come sito di legame alternativo al recettore centrale (CBR) per la benzodiazepina Diazepam: questi studi hanno evidenziato la presenza di tale proteina dapprima nel rene e poi in molti altri tessuti. Nonostante l'esatta funzione del TSPO non sia ancora definitivamente chiarita, il suo coinvolgimento è stato osservato in numerosi processi cellulari come la respirazione mitocondriale, la modulazione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, la crescita e il differenziamento cellulare, l'induzione dell'apoptosi, l'immunomodulazione, il trasporto delle porfirine, la biosintesi dell'eme, la risposta allo stress e la steroidogenesi (Papadopoulos et al., 2006).

Il TSPO è una proteina evolutivamente conservata di 18kDa e altamente idrofobica, costituita da 5 domini transmembranalici ad  $\alpha$ -elica, ciascuno costituito da circa 21 amminoacidi che attraversano il doppio strato fosfolipidico della membrana mitocondriale esterna (OMM). L'estremità carbossil-terminale è situata nel citoplasma e quella ammino-terminale è invece rivolta verso l'interno del mitocondrio (Austin et al., 2013).

La localizzazione subcellulare del TSPO è stata studiata in vari organi: i siti autoradiografici di alcuni ligandi specifici al TSPO avevano una distribuzione istochimica simile a quella della citocromo ossidasi e delle monoammino ossidasi (MAO), marker per i mitocondri (Gatliff, 2012). Il fatto che un'analogica correlazione non sia stata trovata con i marker per i nuclei, i lisosomi, i perossisomi ed il reticolo endoplasmatico ha suggerito che il TSPO è associato con la frazione mitocondriale. In particolare alcuni studi successivi hanno dimostrato che il TSPO è associato alla membrana esterna del mitocondrio poiché la sua densità, per mg di proteina, risulta maggiore nella membrana esterna rispetto al mitocondrio nel suo insieme. Dal momento che è stata evidenziata la presenza del TSPO anche sulla membrana mitocondriale interna è stato suggerito che probabilmente tale recettore sia localizzato sui siti di contatto tra le due membrane mitocondriali.

Per quanto riguarda la localizzazione tissutale il TSPO è stato riconosciuto



**Figura 9:** Struttura del TSPO. Da Austin et al. (2013).

come una proteina pressoché ubiquitaria in quanto la sua presenza è stata evidenziata nel rene, nel cuore, nel polmone, nel tessuto ematopoietico, nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) e nei tessuti endocrini, specialmente quelli coinvolti nel processo di sintesi degli steroidi (in particolare il surrene, l'ovario, il testicolo, le ghiandole surrenali e salivari, la placenta). A livello del SNC il TSPO è espresso quasi esclusivamente nelle cellule gliali e a livelli minori nei neuroni (Gatliff, 2012).

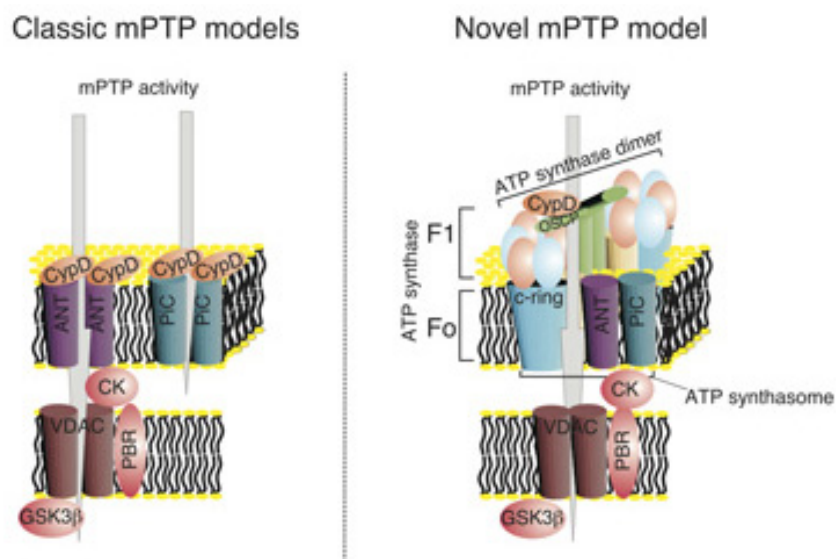
### 1.3.1 Ruoli fisiologici del TSPO

Il TSPO riveste un ruolo chiave nella funzionalità cellulare: l'importanza di tale proteina è suggerita dall'arresto precoce dello sviluppo embrionale in topi *knock-out* per il gene codificante il TSPO (Papadopoulos et al., 2006). Ad essa sono attribuite, tra le altre, le funzioni di regolazione della proliferazione cellulare, trasporto di porfirine (protoporfirina IX, mesoporfirina IX, emina), sintesi dell'eme, immunomodulazione, regolazione della steroidogenesi e apoptosi.

*TSPO e steroidogenesi.* La biosintesi degli steroidi inizia in tutti i tessuti steroidogenici con la conversione enzimatica del precursore colesterolo in pregnenolone. Il passaggio limitante la velocità di questo processo è il trasporto del colesterolo dai depositi intracellulari attraverso lo spazio acquoso intermembranale verso il lato della membrana mitocondriale interna rivolta verso la matrice, a livello della quale è presente l'enzima colesterolo desmolasi (citocromo P450<sub>scc</sub>) che catalizza la reazione. Il passaggio del colesterolo all'interno del mitocondrio avviene con meccanismi non ancora del tutto chiariti: il principale regolatore di tale passaggio è la proteina StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*), che permette il rapido flusso di colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna. Per il riconoscimento e la veicolazione del colesterolo necessario alla steroidogenesi mitocondriale risulta inoltre fondamentale la formazione di un complesso multimolecolare, che vede l'interazione della proteina StAR con il TSPO, la proteina citosolica PAP7 (*PBR associated protein 7*), la proteina VDAC-1 (*voltage-dependent anion channel*) e la subunità regolatoria RI $\alpha$  della protein chinasi A (Miller, 2013). Le modalità attraverso cui queste proteine interagiscono e veicolano il colesterolo attraverso le membrane mitocondriali rimangono oggetto di continui studi.

È noto come i livelli sistemici di steroidi aumentino in seguito ad una lesione, ad un dolore o ad una febbre in risposta alla stimolazione da parte di specifiche citochine della secrezione del fattore di rilascio delle corticotropine. Il coinvolgimento del TSPO nella sintesi di steroidi può quindi contribuire a questo meccanismo difensivo. Inoltre la relazione presente fra i bassi livelli di steroidi e varie tipologie di disturbi psichici come i disturbi d'ansia o da stress post-traumatico ha suggerito l'utilizzo del TSPO come un promettente target per il trattamento dei disturbi psichiatrici, che sono correlati ad una disfunzione nella sintesi di neurosteroidi. Alcuni composti altamente affini al TSPO come PK11195 e la classe delle N,N-dialchil-2-fenilindol-3-ilgliosilamidi hanno mostrato come effetto un aumento della biosintesi di neurosteroidi come pregnenolone e allopregnenolone, che sono modulatori allosterici positivi del recettore GABA<sub>A</sub> ed esercitano effetti ansiolitici (Da Pozzo et al., 2012). Tali ligandi potrebbero quindi rappresentare una valida alternativa alle diverse terapie dei disturbi d'ansia.

*TSPO e apoptosi.* La cascata apoptotica che porta alla morte cellulare è stata ben caratterizzata e in tale processo l'evento critico risulta essere la dissipazione del potenziale transmembranale mitocondriale causata dall'apertura del poro di transizione mitocondriale (MPTP). La struttura di tale poro è ancora oggi oggetto di accurati studi e i risultati ottenuti sono spesso contrastanti: il modello classico identificava nelle proteine VDAC-1 (*voltage-dependent anion channel*) e ANT (*adenosine nucleotide transporter*) i due costituenti fondamentali del poro, situati rispettivamente sulle membrane mitocondriali interna ed esterna. Recenti studi hanno invece avanzato una nuova interpretazione, secondo la quale il poro di transizione mitocondriale si formi dalla dimerizzazione della ATP-sintasi e tale processo sia finemente regolato e modulato da numerose molecole, tra cui ciclofillina-D (Figura 10) (Giorgio et al., 2013).



**Figura 10:** Il vecchio modello proposto per il PTP (a sinistra) comprende l'attività di canalizzazione di ANT sulla membrana mitocondriale interna e del VDAC su quella esterna, circondati da un gran numero di regolatori (CypD, PBR, GSK3β e CK tra i più rappresentativi). Recentemente è stato proposto un nuovo modello (a destra nella figura) che considera la subunità C della ATP sintasi mitocondriale come un componente chiave del PTP.

L'apertura del poro, se reversibile e a basso livello di conduttanza, causa un netto influsso di ioni ed acqua dentro la matrice mitocondriale al fine di mantenere il corretto equilibrio ionico dell'organello. L'apertura prolungata del MPT-poro può al contrario innescare una serie di meccanismi che hanno importanti conseguenze sulla fisiologia mitocondriale e sull'equilibrio bioenergetico della cellula. Un tale evento ha un effetto critico sull'omeostasi ionica favorendo il rilascio di calcio dalla matrice, il rigonfiamento colloidale-osmotico della matrice mitocondriale (*swelling*) e la fuoriuscita dal mitocondrio di molecole tra cui il citocromo C e la flavoproteina AIF (fattore d'induzione dell'apoptosi). Quest'ultima trasloca nel nucleo dove induce condensazione della cromatina e frammentazione del DNA. Nel citosol il citocromo C interagisce con Apaf-1 (fattore attivante dell'apoptosi) innescando le reazioni della caspasi che portano all'attivazione di un complesso di enzimi fondamentale nell'indurre il riarrangiamento strutturale del nucleo, del citoscheletro e della membrana plasmatica, caratteristici dell'apoptosi. L'MPTP quindi risulta un elemento critico nel processo della morte cellulare e rappresenta il punto di non ritorno dell'intero evento apoptotico.

Il TSPO ed i suoi ligandi sono stati proposti quali modulatori del processo apoptotico, ma l'esatto meccanismo non è stato ancora completamente chiarito. La regolazione può avvenire a diversi livelli e il meccanismo proposto include la modulazione dell'MPTP o la diretta interazione con molecole pro- o anti-apoptotiche (Gatliff, 2012). Una elevata espressione di tale recettore è stata riscontrata nelle cellule e nei tessuti neoplastici dell'ovaio, nell'adenocarcinoma, nel carcinoma del fegato, del colon e in particolare nei gliomi; l'aumento dell'espressione del TSPO è poi correlabile con il grado di aggressività della forma tumorale (Rechichi et al., 2008). L'ipotesi che il TSPO partecipi allo sviluppo della malattia è supportata dalla sua localizzazione anche a livello nucleare e perinucleare in alcune linee cellulari cancerose: in questa sede il recettore regolerebbe la proliferazione cellulare facilitando il trasporto del colesterolo nel nucleo. Inoltre studi di imaging diagnostico non invasivo, mediante l'utilizzo di ligandi marcati per il TSPO ( $[^3\text{H}]$ PK11195;  $[^{18}\text{F}]$ DPA-714), hanno fornito dati di notevole interesse nella visualizzazione dei tumori in test come la tomografia a emissione di positroni (PET) (Trapani et al., 2013).

E' stato ampiamente dimostrato come i suoi ligandi possano modulare l'apertu-

ra di MPTP (Veenman, 2012). Diversi ligandi al TSPO sono in grado di diminuire il potenziale di membrana mitocondriale, provocando apoptosi e arresto del ciclo cellulare nella fase  $G_1/G_0$  in diverse linee cellulari tumorali (Veenman, 2012). Altre molecole come PK11195 e Ro5-4864 mostrano una risposta farmacologica bifasica: a concentrazioni tra i 10 e i 100 nM attivano segnali anti-apoptotici che si traducono in una aumentata vitalità e proliferazione cellulare; a concentrazioni superiori, nell'ordine del micromolare, si osserva al contrario un'azione pro-apoptotica e anti-proliferativa. Resta tuttavia da chiarire appieno la relazione che esiste tra l'aumentata espressione del TSPO e l'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico dei suoi ligandi nelle cellule tumorali.

*TSPO e immunomodulazione.* La presenza del TSPO in un gran numero di cellule immunomodulatorie come la microglia, i monociti del sangue, i linfociti e i leucociti, ha portato a pensare ad un coinvolgimento del TSPO nella risposta immunitaria; tuttavia il meccanismo attraverso il quale ciò avviene è ancora sconosciuto. I macrofagi presentano molti siti di legame per il TSPO e in particolari studi effettuati sui topi è stato osservato che le benzodiazepine inibiscono la capacità dei macrofagi di produrre ROS e alcune citochine infiammatorie come ad esempio IL-1, TNF e IL-6. Inoltre il TSPO è coinvolto nel metabolismo ossidativo ad opera dei fagociti, processo necessario per eliminare definitivamente antigeni esterni. La funzione immunosoppressiva di alcuni ligandi che vanno ad interagire con il TSPO ha dimostrato l'importante ruolo rivestito da questa proteina nella risposta infiammatoria. Nel SNC il TSPO è espresso prevalentemente nelle cellule microgliali. L'attivazione della microglia dà inizio ad una risposta infiammatoria che può esacerbare la perdita neuronale in varie malattie infiammatorie neurodegenerative, come ad esempio nel morbo di Alzheimer. Poiché si è osservata una sovraespressione di TSPO nella microglia attivata, si è pensato che l'infiammazione presente a livello cerebrale durante le patologie neurodegenerative coinvolga tale recettore (Bae et al., 2014). Si presenta così la possibilità di utilizzare degli specifici ligandi per il TSPO per prevenire o limitare la neuroinfiammazione. Tuttavia il coinvolgimento della microglia attivata in varie patologie del SNC è differente a seconda del suo ruolo nella progressione e nella gravità della patologia. E' plausibile quindi ipotizzare che attraverso l'utilizzo del TSPO come marker di tali cellule



sia possibile determinare con esattezza quale ruolo la neuroinfiammazione gioca in specifiche condizioni patologiche che coinvolgono il SNC (Kreisl et al., 2013).

*Respirazione cellulare e coinvolgimento nel processo ossidativo.* I ligandi del TSPO aumentano il ritmo dello stadio IV della respirazione e diminuiscono lo stadio III producendo una significativa diminuzione del controllo della respirazione. I ligandi PK11195 e Ro5-4864 sono anche in grado di alterare il consumo dell'ossigeno nelle cellule di neuroblastoma di topo C-1300 e nei mitocondri della corteccia cerebrale di ratto. Inoltre l'esposizione di cellule neuronali ai ligandi di TSPO in vitro genera radicali non legati all'ossigeno con un processo che coinvolge l'MPTP. PK11195 modula i cambiamenti mediati dell'ossigeno nell'espressione del fattore respiratorio nucleare 1 e blocca le malformazioni oculari durante lo sviluppo embrionale indotti dall'ipossia e dalla 2'-desossiadenosina. Questi risultati indicano il TSPO come un potenziale mediatore nei meccanismi di risposta allo stress durante la fase embrionale (Veenman, 2012).

*Trasporto delle porfirine e biosintesi dell'eme.* Le porfirine dicarbossiliche legano il TSPO, il quale è anche coinvolto nel metabolismo nei mammiferi dei tetrapirroli. Inoltre l'omologo del TSPO dei mammiferi nel *Rhodobacter sphaeroides*, chiamato trasportatore dell'ossigeno sensibile all'arricchimento in triptofano regola la formazione del complesso fotosintetico di membrana ed è coinvolto nel trasporto degli intermedi delle porfirine (Rosenberg et al., 2013).

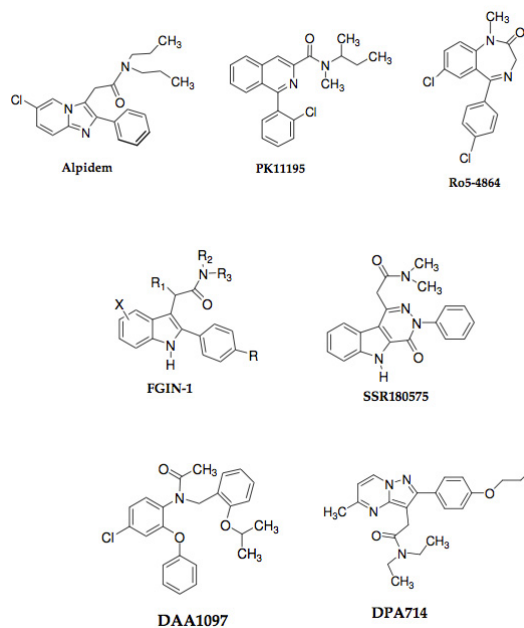
### 1.3.2 Ligandi endogeni e di sintesi al TSPO

La comprensione dei meccanismi attraverso i quali il TSPO modula le risposte cellulari, insieme alla descrizione delle variazioni della sua espressione, costituisce la base razionale per un uso terapeutico dei ligandi di tale recettore. Di conseguenza il TSPO ha assunto un notevole interesse come possibile target terapeutico. Una grande varietà di molecole endogene mostra alta affinità per il TSPO. Una delle prime molecole identificate, isolata sia a livello centrale che nei tessuti periferici (ghiandola surrenale, rene e testicoli), è un residuo di neuropeptide di 11 kDa composto da 86 aminoacidi che inibisce il legame del diazepam con il sito recettoriale delle benzodiazepine, chiamato “inibitore del legame del diazepam (DBI)”. Oltre a questa molecola e ai suoi metaboliti sono stati identificati altri ligandi endogeni come le porfirine (protoporfirina IX, mesoporfirina IX ed emina) ed il colesterolo.

Le principali classi di ligandi sintetici descritti in letteratura sono (Da Settimo et al., 2008):

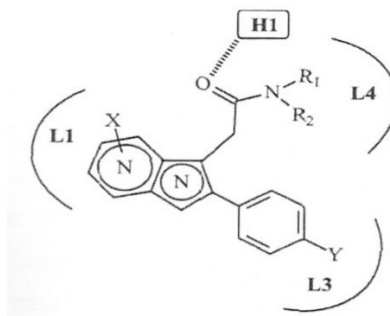
- benzodiazepine (4'-clorodiazepam, Ro5-4864)
- isochinolincarbossamidi (PK11195)
- imidazopiridine (Alpidem)
- derivati indolacetamidici (FGIN-1, SSR180575)
- derivati fenossifenilacetamidici (DAA1097)
- pirazolopirimidine (DP A714)
- N,N-dialchil-2-fenilindol-3-ilgliossilamidi

Tutti questi ligandi mostrano un'alta affinità di legame per il TSPO, con valori di  $K_i$  nell'ordine del nanomolare; essi sono stati utilizzati come strumenti farmacologici di ricerca per caratterizzare le proprietà e le funzioni del TSPO. L'andamento parallelo delle SAR (relazione struttura-attività) dei diversi derivati suggerisce che essi interagiscano con il TSPO in modo del tutto analogo.



**Figura 11:** Struttura di alcuni ligandi di sintesi al TSPO. Da Settimo et al. (2008)

È stato proposto quindi un modello farmacoforico che include tre regioni lipofile (siti L1, L2, L4) ed un gruppo donatore di idrogeno (sito H1)(Figura 12).



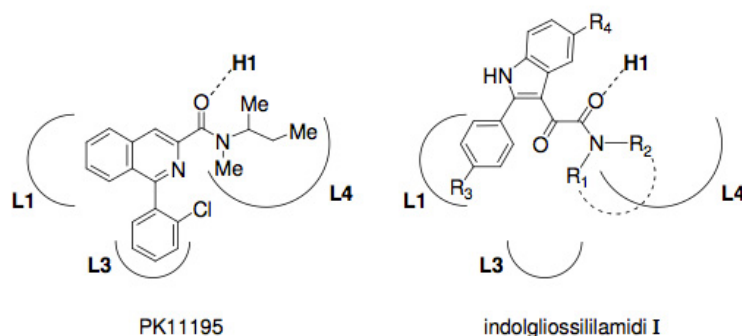
**Figura 12:** Modello farmacoforico per i ligandi al TSPO. Da Settimo et al. (2008)

È possibile ipotizzare che i punti fondamentali di interazione siano:

- il carbonile ammidico che forma legami ad idrogeno con il sito donatore H1;
- il sistema eterociclico azotato ed il gruppo 2-arilico, che vanno ad occupare le aree lipofile L1 ed L3;

- le catene legate all'azoto ammidico che occupano l'area lipofila L4.

La classe delle N,N-dialchil-2-fenilindol-3-ilgliossilamidi, sintetizzati nei laboratori del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa, rappresentano una variazione della struttura base dell'Alpidem e hanno dimostrato un'alta affinità e selettività nei confronti del TSPO. Sono state sintetizzate numerose indolgliossilamidi portanti gruppi sostituenti con diverse proprietà steriche, lipofile ed elettroniche. Moltissimi nuovi derivati sono risultati attivi e selettivi per il TSPO, con valori di  $K_i$  di ordine nanomolare. La selettività verso il recettore periferico è stata accertata con test di binding per il CBR nei quali i composti hanno dimostrato scarsa o nulla affinità. Per alcune delle indolgliossilamidi è stata inoltre evidenziata la capacità di stimolare la biosintesi del pregnenolone in cellule C6 di glioma di ratto. Nella Figura 13 è rappresentato lo schema di interazione delle indolgliossilamidi con il recettore, paragonato con le modalità di legame del derivato isochinolinico PK11195. Applicando il modello farmacoforico alla classe delle



**Figura 13:** Confronto tra i modelli di interazione tra le indolgliossilamidi e PK11195. Da Settimo et al. (2008)

indolgliossilamidi si può ipotizzare che il fenile in posizione 2 sia coinvolto in una interazione con un anello aromatico elettron-ricco presente nell'area lipofila L1 e che questa interazione sia rafforzata da sostituenti elettron-attrattori come gli alogeni o il gruppo nitro in posizione 4'. I sostituenti alchilici  $R_1$  ed  $R_2$  interagirebbero con le aree lipofile L3 e L4, rispettivamente, mentre il secondo carbonile del ponte ossalilico della catena laterale svolgerebbe il ruolo di accettore nella formazione di un legame a idrogeno con il sito H1 presente sul recettore.

## Capitolo 2

### Scopo della tesi

Nel complesso scenario della terapia del cancro, l'utilizzo di composti attivi su pathway intracellulari multipli ha mostrato potenziali benefici in termini di minore farmacoresistenza e aumento di efficacia e tollerabilità. La strategia multi-target può rappresentare quindi un valido approccio per il trattamento del glioblastoma multiforme, un tumore cerebrale particolarmente aggressivo e resistente alle terapie tradizionali. In particolare, molecole ad azione pro-apoptotica che agiscono su pathway di morte mitocondriale si sono rivelate dei promettenti agenti attivi verso diverse forme tumorali, tra cui il GBM. A questo riguardo, la nostra attenzione si è rivolta specificatamente a due sistemi intracellulari: la proteina p53 e la proteina Traslocatrice TSPO, entrambi coinvolti nei meccanismi pro-apoptotici e nella regolazione della proliferazione cellulare. Nonostante numerosi studi abbiano identificato nel TSPO e nel complesso p53/MDM2 due validi target per il trattamento del glioblastoma multiforme, non sono state riportate in letteratura molecole in grado di interagire in modo combinato su entrambi i sistemi. Le potenzialità terapeutiche di tale approccio duale risultano avvalorate dal fatto che la maggioranza dei fenotipi di GBM conserva la proteina p53 *wild-type* e sovraesprime TSPO e MDM2.

In questo lavoro di tesi è stata effettuata una valutazione biologica *in vitro* di molecole di nuova sintesi a struttura fenil-indol-gliossilammidica variamente sostituite: di tali composti è stata valutata la capacità di interagire con il TSPO e riattivare p53, attraverso la dissociazione dal suo inibitore MDM2. Negli esperimenti condotti è stata utilizzata la linea U87MG e come molecole di riferimento il ligando al TSPO PK11195 e l'inibitore di MDM2 Nutlina-3.

# Capitolo 3

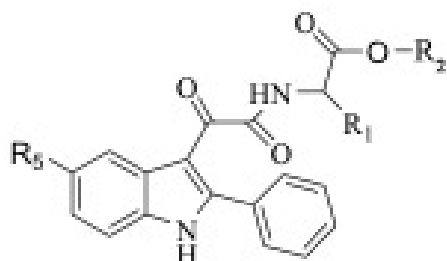
## Materiali e metodi

### 3.1 Composti

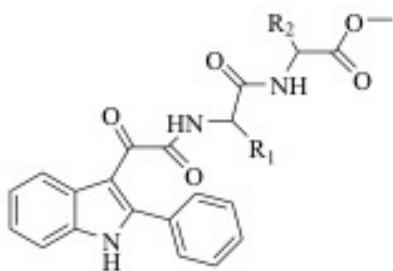
Con lo scopo di ottenere molecole capaci di interagire contemporaneamente con il TSPO e il complesso p53/MDM2, sono stati condotti inizialmente studi di modellazione molecolare, che hanno portato ad identificare nella struttura fenil-indol-gliossilammidica (PIGA) un valido *scaffold* per l'elaborazione e lo sviluppo di molecole che presentino le caratteristiche desiderate. Partendo dai già noti studi di relazione struttura-attività (SAR), che forniscono un quadro ben delineato dell'interazione PIGA-TSPO, e ai dati cristallografici sull'interazione p53/MDM2, sono stati condotti studi di modelling e in seguito sintetizzati numerosi derivati fenil-indol-gliossilammidici.

Nel mio lavoro di tesi si è quindi proceduto ad una valutazione biologica di tali composti, che ha mirato alla loro caratterizzazione per quanto riguarda il dual-targeting nei confronti di p53/MDM2 e TSPO. I dati ottenuti nei diversi esperimenti sono stati confrontati con gli standard di riferimento Nutlina-3 (inibitore p53/MDM2) e PK11195 (ligando al TSPO).

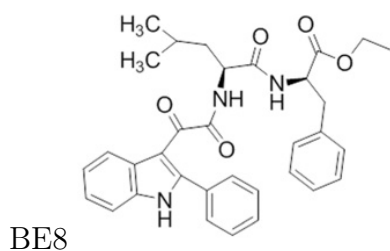
Di seguito sono presentati i 21 composti a struttura fenil-indol-gliossilammidica che sono stati sottoposti ai saggi biologici.



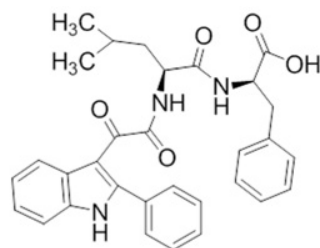
Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>5</sub>
BE10	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H
BE11	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl
BE12	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H
BE14	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl
BE15	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>
BE16	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl
BE17	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>
BE18	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>
BE20	CH <sub>2</sub> C <sub>10</sub> H <sub>7</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H
BE21	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
BE22	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



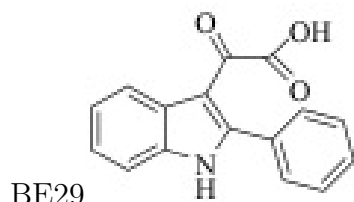
Comp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
BE23	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
BE24	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
BE25	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
BE26	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
BE27	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
BE28	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>



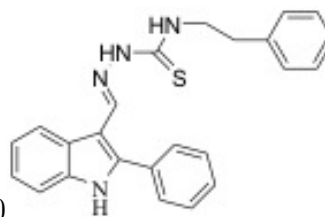
BE8



BE19



BE29

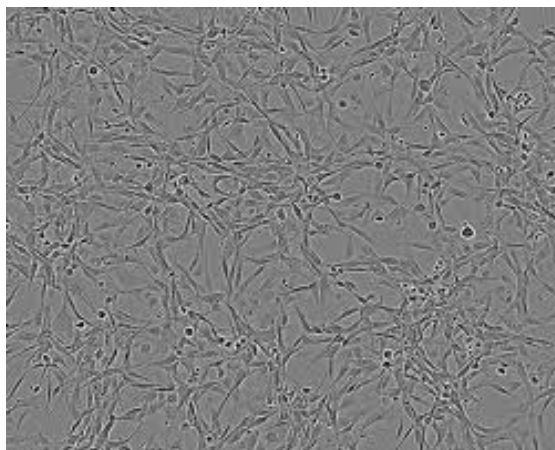


BE30

## 3.2 Linea cellulare e condizioni di coltura

La linea cellulare U87MG, derivante da glioma maligno umano di III grado con morfologia epiteliale, è stata ottenuta dall'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (INCR) di Genova. Le cellule sono state piastrate e mantenute nell'appropriato mezzo completo sterile costituito da:

- RPMI-1640 addizionato di 10% di siero fetale bovino (FBS);
- L-glutammina 2 mM;
- 100 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomina;
- 1% di soluzione di aminoacidi non essenziali (NEAA).



**Figura 14:** Cellule U87MG

La coltura è stata mantenuta nell'incubatore ad una temperatura di 37°C e un'atmosfera umidificata costituita da 5% di CO<sub>2</sub> e 95% di aria. Le cellule sono state staccate ogni 4 giorni e ripiastrate con una diluizione 1:10 ad ogni passaggio.



### 3.3 Studi di dissociazione del complesso p53/MDM2

Come primo step, è stata valutata la capacità dei nuovi composti di dissociare il complesso p53/MDM2 nativo. A tale proposito è stato allestito un saggio immunoenzimatico quantitativo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) su lisato ottenuto da cellule U87MG.

#### 3.3.1 Preparazione lisato cellulare

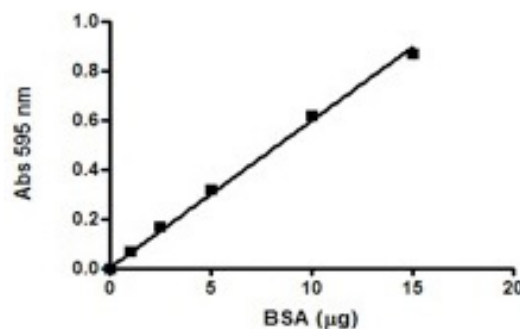
Le cellule U87MG vengono piastrate in petri. Una volta raggiunta la sub-confluenza, si aspira il mezzo da ciascun pozzetto e si lavano le cellule con 5 mL di PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9.1 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.7 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). Le cellule vengono quindi staccate dalla piastra meccanicamente con uno scraper, raccolte in falcon e centrifugate a  $500 \times g$  per 5 minuti. I pellets ottenuti vengono sospesi in un opportuno tampone di lisi (Tris HCl 20mM, NaCl 137mM, glicerolo 10%, Nonidet P-40 1%, EDTA 2mM, pH 8) contenente *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma Aldrich) all'1%. I lisati ottenuti vengono raccolti in eppendorf, messi in agitazione per 1 ora a una temperatura di  $4^\circ\text{C}$  e infine centrifugati a  $13500 \times g$  per 45 minuti a  $4^\circ\text{C}$ . Viene quindi raccolto il sovranatante, che costituisce il lisato, su cui si esegue il dosaggio proteico.

#### 3.3.2 Dosaggio proteico Bio-Rad

La quantificazione delle proteine totali nel lisato cellulare è stata effettuata con il metodo Bio-Rad: tale dosaggio utilizza il colorante acido *Comassie Brilliant Blue G-250*, che cambia colore in seguito al legame con specifici residui aromatici e basici presenti nel campione (soprattutto Lisina e Arginina). Il saggio viene allestito nel seguente modo:

- Bianco:  $795 \mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  +  $5 \mu\text{L}$  di tampone (utilizzato per sospendere il campione) +  $200 \mu\text{L}$  di biorad concentrato.
- Campione:  $795 \mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  +  $5 \mu\text{L}$  di campione +  $200 \mu\text{L}$  di biorad concentrato.

In seguito si leggono i campioni a 595 nm e dal valore di assorbanza si risale alla concentrazione delle proteine in 5  $\mu$ L di campione. Ciò è possibile facendo riferimento ad un campione standard a concentrazione proteica nota: a tale scopo è stata misurata l'assorbanza a 595 nm di campioni di albumina sierica bovina (BSA) a titolo noto (corrispondenti a 2,5-5-10-15-20  $\mu$ g di proteina in prova): dai risultati è stato quindi possibile costruire una retta di taratura, mostrata in Figura 15. Per la creazione della curva è stato selezionato l'intervallo di concentrazioni in cui il rapporto assorbanza/concentrazione risulta lineare.



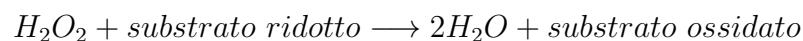
**Figura 15:** La retta di taratura ottenuta è rappresentata dall'equazione

$$y = 0.05954x$$

### 3.3.3 Kit ELISA "home-made"

Il saggio ELISA, acronimo inglese per *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima), è un metodo di analisi immunologica, alternativo ai saggi di co-immunoprecipitazione/western blotting, utile per rilevare la presenza di una sostanza attraverso l'impiego di un anticorpo primario ed un anticorpo secondario coniugato ad un enzima, che catalizza una reazione il cui prodotto è visibile e quantificabile. Il saggio ELISA, utilizzato in questo lavoro di tesi, è un saggio di tipo diretto "a sandwich" articolato nelle seguenti fasi:

1. In un multiwell da 96 viene effettuato un *pre-coating* con anticorpo anti-MDM2 diluito 1:50 in Poli-L-Ornitina disciolta allo 0.05% in PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9.1 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.7 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) e lasciato overnight a temperatura ambiente.
2. I pozzetti vengono poi lavati 3 volte per 5 minuti con 100  $\mu\text{L}$  di PBS Tween 0.01% (PBS + Tween 20 0.01%).
3. 100  $\mu\text{L}$  di lisato (15  $\mu\text{g}$  di proteine, portando a volume con tampone di lisi) vengono pre-incubati con DMSO (controllo) o con i composti a diverse concentrazioni per 10 minuti a temperatura ambiente, su piastra agitante; in seguito vengono trasferiti nei rispettivi pozzetti rivestiti con anticorpo anti-MDM2 e lasciati in incubazione per 60 minuti.
4. Dopo tre lavaggi con PBS/Tween allo 0.05% necessari alla rimozione dei componenti del lisato cellulare che non si sono legati all'anticorpo anti-MDM2, a ciascun pozzetto vengono aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di una soluzione all'1% di BSA (Albumina Sierica Bovina) per 15 minuti al fine di bloccare i siti aspecifici.
5. I campioni vengono poi incubati 90 minuti con un anticorpo primario anti-p53 (diluito 1:250 in Milk [TBS ( $\text{Tris-HCl}$  10 mM, NaCl 150 mM, pH 8); Milk 5%; Tween 20 0.05%]): esso andrà a riconoscere e legare esclusivamente la quota di proteina p53 rimasta legata a MDM2.
6. Trascorso il tempo stabilito e operati due lavaggi consecutivi, i pozzetti vengono incubati per 60 minuti con un anticorpo secondario (diluito 1:3000 in Milk) diretto verso l'anticorpo primario anti-p53. L'anticorpo secondario è coniugato ad HRP (*Horse radish Peroxidase*), un enzima che catalizza la reazione:

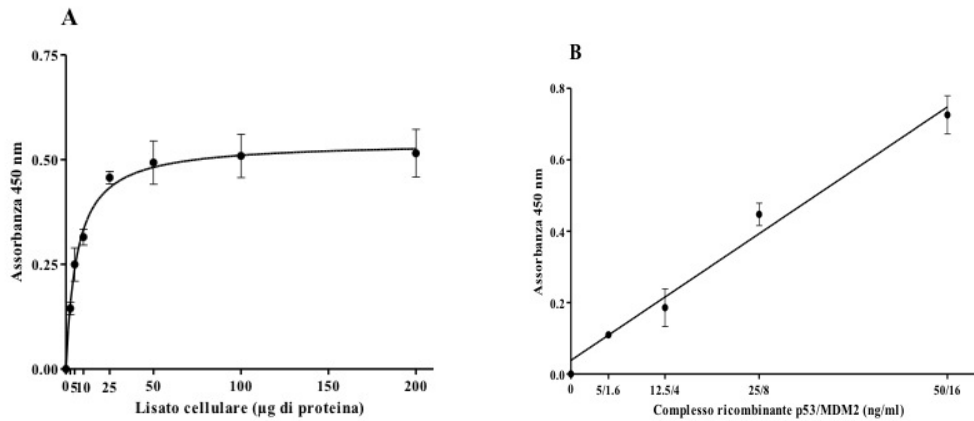


7. Al termine dell'incubazione si effettuano 2 lavaggi da 5 minuti con 100  $\mu\text{L}$  di PBS + Tween 0,01% , seguiti da 2 lavaggi rapidi in PBS.
8. Si aggiunge quindi il substrato TMB (3,3',5,5' Tetrametilbenzidina) che in presenza di  $\text{H}_2\text{O}_2$  cambia visibilmente colore. Avvenuto il viraggio si blocca

la reazione con una Stop Solution ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluito 1:9.21 in  $\text{H}_2\text{O}$ ) e si legge l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Il saggio ha permesso una quantificazione colorimetrica del complesso p53/MDM2: per la validazione del metodo sperimentale si è inizialmente valutata la proteina-dipendenza del saggio, tramite l'aggiunta di aliquote sempre crescenti di lisato cellulare. Come mostrato in Figura 16A, i valori di assorbanza specifica a 450 nm aumentano proporzionalmente con l'aumentare della concentrazione proteica dei lisati cellulari di U87MG, con una tendenza alla saturazione a partire da 40  $\mu\text{g}$  di proteine. I bianchi sono stati ottenuti escludendo l'anticorpo primario anti-p53. L'assorbanza a 450 nm di tali pozzetti è rimasta sempre sotto il 20% del valore totale. Per evitare fenomeni di cross-linking, l'anticorpo primario utilizzato è stato ottenuto da una specie animale diversa da quella dell'anticorpo utilizzato per il pre-coating (Zappelli et al., 2014).

Il saggio è stato inoltre validato utilizzando concentrazioni crescenti di proteina ricombinante p53/MDM2 (Figura 16B): gli standard di p53 e MDM2 sono stati ricostituiti e complessati seguendo le istruzioni dell'azienda produttrice (*Enzo Life Sciences*). Una curva semi-quantitativa del complesso p53/MDM2 è stata ottenuta utilizzando concentrazioni crescenti dei due componenti, da 12.5/4 ng fino a 50/16 ng.

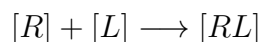


**Figura 16:** Differenti quantità di lisato cellulare (A) o di complesso ricombinante p53/MDM2 (B) sono stati utilizzati per la validazione del saggio. I dati sono espressi come assorbanza a 450 nm e rappresentano la media  $\pm$ SEM di tre esperimenti indipendenti.

### 3.4 Studi di binding competitivo su TSPO con radioligando [ $^3\text{H}$ ]-PK11195

Il saggio di radiobinding è una tecnica biochimica che permette di stabilire, con l'ausilio di radioisotopi, la presenza di siti di legame (*binding sites*) specifici per il ligando utilizzato in cellule o in frazioni subcellulari.

La tecnica di binding radioattivo recettoriale prevede l'incubazione dell'omogenato di tessuto opportunamente diluito, contenente il recettore in esame con un ligando specifico per tale recettore marcato con un isotopo radioattivo. L'incubazione deve essere eseguita a temperatura, tempo e pH sufficienti al raggiungimento dell'equilibrio di legame. Durante l'incubazione una certa quantità di ligando (L) lega il recettore (R) e forma il complesso recettore-ligando (RL). La formazione del complesso recettore-ligando avviene grazie ad una reazione reversibile che segue la legge d'azione di massa:



Dove [L] è la concentrazione del ligando, [R] è la concentrazione del recettore e [LR] è la concentrazione del complesso ligando-recettore. La formazione del complesso LR è una reazione reversibile che possiede una costante di equilibrio:

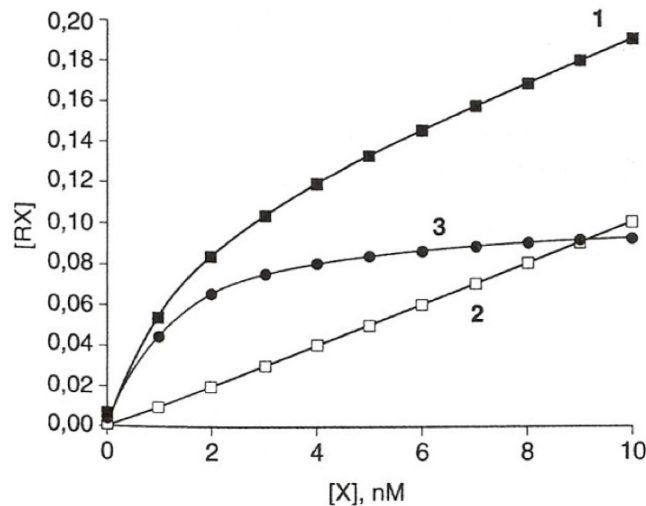
$$K_a = [LR]/[R][L]$$

$K_a$  viene definita costante di affinità ed indica quanto la reazione è spostata verso destra ed è quindi correlata alla forza del legame del ligando al recettore. Negli studi di binding si utilizza invece la costante di dissociazione  $K_d$  della reazione inversa e cioè:

$$K_d = [R][L]/[LR] = 1/K_a$$

Per determinare la quantità di complesso recettore-ligando formatasi all'equilibrio è necessario terminare l'incubazione con una procedura che permetta di separare il ligando legato al recettore da quello ancora libero e presente nel mezzo di incubazione. Il metodo utilizzato per terminare la reazione di binding è quello della filtrazione che consiste nel filtrare il mezzo di incubazione, contenente quindi sia il complesso recettore-ligando che il ligando libero, sottovuoto attraverso filtri

in fibra di vetro, su cui si deposita il tessuto con il ligando legato al recettore. Prima della filtrazione si dispensa velocemente il tampone freddo nel mezzo di incubazione per poter bloccare la reazione e impedire la dissociazione del complesso recettore-ligando, dopo la filtrazione si effettua un ulteriore lavaggio per allontanare dai filtri la radioattività non legata.



**Figura 17:** Calcolo del legame specifico a partire dal legame totale e del legame non specifico in un esperimento di binding per spiazzamento. Curva 1: Legame Totale; Curva 2: Legame Aspecifico; Curva 3: Legame Specifico.

Dai dati della radioattività si ricava quindi il legame totale ( $L_T$ ), la cui curva è mostrata in Figura 17-1: tale curva non raggiunge un plateau, ma tende a salire in modo rettilineo nonostante il legame ad un recettore sia un fenomeno saturabile. Questa discrepanza fra teoria e pratica è dovuta all'esistenza di un compartimento a cui il ligando si lega in modo non saturabile; il legame non saturabile, dovuto sia al preparato biologico, sia al sistema di separazione di RL da L, viene definito binding non specifico, e si misura valutando il legame residuo di ogni concentrazione di ligando radioattivo in presenza di un forte eccesso (almeno 100 volte rispetto al ligando marcato) di ligando non marcato (Figura 17-2). Calcolando la differenza fra le curve 1 e 2, si ottiene la curva 3 di binding specifico: la Figura 17-3 mostra come il legame specifico, essendo un fenomeno saturabile, aumenti linearmente in funzione della concentrazione del ligando fino a raggiungere un plateau (*steady-*

state). Attraverso questa tecnica, affiancata dal concetto di competizione è stato possibile determinare i parametri di binding dei composti in esame all'equilibrio.

*Procedura operativa:* L'omogenato tissutale, costituito da membrane mitocondriali di rene di ratto (20  $\mu$ g di proteine) in Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, è stato incubato con il radioligando [ $^3$ H]-PK11195 0.6 nM in presenza di concentrazioni crescenti (0.1 nM - 10  $\mu$ M) dei composti BE23, BE25, BE27, BE28, BE54, BE106, in un volume finale di 0.5 mL per un tempo di 90 minuti a 4°C. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla filtrazione dei campioni su filtri in microfibra di vetro GF/C e successivi tre lavaggi con tampone freddo. I livelli di radioattività sono stati infine misurati tramite contatore a scintillazione liquida, che fornisce le disintegrazioni per minuto (dpm). Dal valore dei dpm è possibile risalire alla radioattività ( $\mu$ Ci) presente nei campioni attraverso la seguente relazione:

$$1 \mu Ci = 2.220.000 \text{ dpm}$$

Infine conoscendo l'attività specifica del radioligando (A.S. =  $\mu$ Ci / nmo-li) è possibile determinare le nanomoli di radioligando presenti come complesso radioligando-recettore all'equilibrio.

I valori di legame del radioligando sono stati quindi riportati come percentuali del legame specifico, in funzione del logaritmo della concentrazione dell'agente competitore. Per poter quantificare l'affinità dei composti verso il sito recettoriale, dalla curva di competizione è stato possibile determinare tramite il software GraphPad Prism 5 la concentrazione di competitore in grado di inibire per il 50% il legame specifico del radioligando ( $IC_{50}$ ). L' $IC_{50}$  determinata negli studi di binding viene trasformata in costante di inibizione ( $K_i$ ) del competitore, mediante l'equazione di Cheng e Prusoff:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L]/K_d)$$

Dove:

$K_d$  = costante di dissociazione del radioligando

$[L]$  = concentrazione del radioligando

## 3.5 Analisi Western Blot su p53

L'attività inibitoria dei composti nei confronti di MDM2 e la conseguente stabilizzazione della proteina p53 è stata valutata attraverso l'utilizzo della tecnica del Western blotting.

### 3.5.1 Trattamento e preparazione dei lisati cellulari

Le cellule U87MG sono state trattate con DMSO (controllo) o con concentrazioni crescenti dei tre composti BE28, BE54 e BE106 (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) per 12 ore. Terminato il tempo del trattamento si è proceduto alla lisi cellulare con tampone di lisi RIPA ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9.1 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.7 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, 0.5% sodio desossicolato, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS e un cocktail di inibitori delle proteasi).

### 3.5.2 Elettroforesi delle proteine in gel di poliacrilamide con SDS (SDS-PAGE)

Questa metodica consente di separare proteine di diverso peso molecolare mediante la loro migrazione attraverso le maglie di un gel di poliacrilamide sotto l'azione di un campo elettrico. Tale separazione è resa possibile grazie al sodiododecilsolfato (SDS), un detergente anionico capace di complessarsi alle proteine e di conferire loro una carica netta negativa costante per unità di massa. Ne consegue che esse vengono separate sulla base del loro peso molecolare.

E' stata effettuata una separazione proteica mediante elettroforesi in verticale su gel di poliacrilamide, secondo il metodo di Laemmli. I campioni, contenenti uguali quantità di proteine del lisato cellulare (30  $\mu$ g) e sospesi in una soluzione di Laemmli (Tris HCl 1 M pH 6.8, SDS 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerolo,  $\text{H}_2\text{O}$ , blu di bromofenolo) contenente ditiotreitolo (DTT) 200 mM, vengono caricati su gel di poliacrilamide: tale gel ha uno spessore di circa 1 mm ed è formato da un gradiente discontinuo di due gel a pH e concentrazioni di acrilamide diversi: un gel superiore di impaccamento (*stacking gel*) e uno inferiore di corsa (*running gel*), dove avviene la separazione delle proteine. Lo stacking gel è stato preparato al 4% mentre il running gel all'8.5% di acrilamide. Come marcatore dei pesi molecolari



è stato utilizzato lo *Standard Rainbow* (Biorad).

La corsa elettroforetica è avvenuta in una camera per elettroforesi riempita con tampone di corsa costituito da 192 mM glicina, 25 mM Tris e SDS 0.1%. Alla camera elettroforetica è stato applicato un amperaggio di 10 mA per i primi 30 minuti, al fine di favorire l'impaccamento delle bande nello stacking gel; successivamente una corrente di 20 mA per 1 ora e 30 minuti, allo scopo di separare le proteine nel running gel.

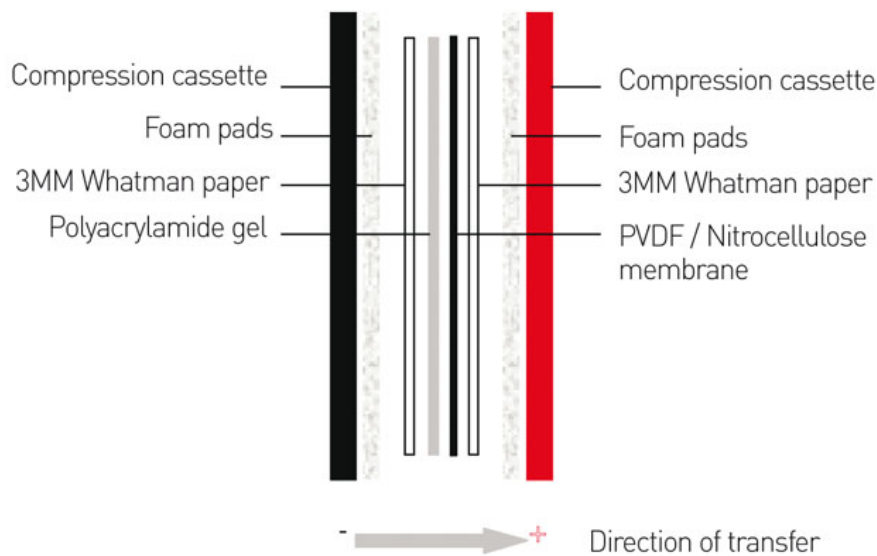
### 3.5.3 Electroblotting

Il metodo consiste nell'elettrotrasferimento di proteine dalla matrice del gel di acrilamide, in cui sono state fatte migrare, ad una membrana di polivinilidenfluoruro (PVDF). Una volta fissate nella membrana, le proteine possono poi essere analizzate per mezzo di anticorpi specifici diretti contro epitopi antigenici esposti dalle proteine stesse. Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di PVDF è stato effettuato mediante un sistema continuo assemblato in un apposito blottatore (Figura 18).

È stato allestito un sandwich costituito, nell'ordine dall'anodo al catodo, da spugna, da due fogli di carta da filtro, dalla membrana di PVDF, dal gel di poliacrilamide e nuovamente carta da filtro e spugna. I fogli di carta da filtro sono stati precedentemente immersi per qualche minuto nel tampone di trasferimento (Tris 49.6 mM, glicina 384 mM, 20% metanolo e 0,01% SDS), mentre la membrana di PVDF è stata pre-attivata in metanolo. La procedura di blottaggio viene eseguita applicando un voltaggio di 100 V per 2 ore, mantenendo basse le temperature.

### 3.5.4 Lavaggi ed incubazione

Terminato il trasferimento, si apre il sandwich e la membrana di PVDF viene immersa completamente in Milk [TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8); Milk 5%; Tween-20 0.05%], mantenendola in agitazione sul basculante per almeno 1 ora a temperatura ambiente (il Milk ha l'importante funzione di bloccare tutti i siti di legame aspecifici presenti sul foglio di PVDF). Il blot viene poi incubato con un anticorpo primario anti-p53 (diluito 1:500) e tenuto in agitazione a 4°C per tutta la notte; la mattina seguente il PVDF viene lavato per tre volte con TBS-



**Figura 18:** Schema dell'elettrotrasferimento delle proteine dal gel di poliacrilamide alla membrana di PVDF.

Tween-20 (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM, pH 8; Tween-20 0.05%) e poi incubato a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario, diluito 1:10000 in milk. Al termine di due ore di incubazione vengono fatti altri tre lavaggi da 5-10 minuti con TBS-Tween e un lavaggio da 5-10 minuti con TBS. A questo punto si recupera il foglio di PVDF e si ripone in una vaschetta dove viene aggiunto un reagente luminescente *ECL* per 1 minuto; si asciuga il foglio e si posiziona tra due pellicole trasparenti, per poi trasferirlo nella cassetta di sviluppo a contatto con la lastra fotografica. L'anticorpo secondario, che riconosce l'anticorpo primario precedentemente legato, è marcato con la perossidasi di rafano, che in presenza di perossido di idrogeno ossida il luminolo, dando luogo al fenomeno della chemiluminescenza, in grado di impressionare una lastra fotografica esposta al PVDF.

## 3.6 Quantificazione relativa dell'espressione di geni target di p53

Per valutare la capacità dei composti BE28, BE54 e BE 106 di riattivare l'attività trascrizionale di p53, è stata condotta una Real Time RT-PCR in cellule U87MG per la quantificazione relativa degli mRNA dei principali geni bersaglio di p53 (p21, MDM2 e PUMA).

Nella PCR tradizionale la presenza del prodotto amplificato viene rilevata da un'analisi successiva alla PCR stessa, ovvero tramite una corsa elettroforetica del DNA su gel di agarosio. Al contrario la Real Time PCR consente il rilevamento e la misurazione del prodotto di amplificazione in tempo reale: ciò è reso possibile includendo nella reazione una molecola fluorescente che aumenta la propria emissione con l'accumularsi del prodotto amplificato. Quindi la fluorescenza misurata riflette la quantità di prodotto amplificato in ogni ciclo. Infine, poiché le reazioni e l'elaborazione dei dati sono gestiti e processati in un sistema chiuso, le possibilità di contaminazione sono molto ridotte e viene eliminata la manipolazione post-amplificazione. Di seguito vengono descritte le fasi del processo e la procedura operativa.

### 3.6.1 Trattamento delle cellule ed estrazione dell'RNA totale

Le cellule sono state seminate in piastre da 10 cm di diametro e trattate con DMSO o con composti (5  $\mu$ M) per un tempo di 8 ore; successivamente sono state staccate e centrifugate a 500g per 5 minuti. Per l'estrazione dell'RNA dai pellet cellulari ai fini di analizzare il livello di espressione dei geni d'interesse, è stato utilizzato il kit *RNeasy Mini kit* (Qiagen). Il pellet è stato risospeso in una soluzione costituita da 600  $\mu$ L di buffer RLT e 10  $\mu$ L/ml di  $\beta$ -mercaptoetanololo. La soluzione è stata vortexata per 1 minuto ed è stato aggiunto un ugual volume di EtOH al 70%. E' stato trasferito il tutto in una colonnina (700  $\mu$ L per volta) e centrifugato per 30" a 10000 rpm e scartato il residuo dal tubo. Sono stati quindi aggiunti 700  $\mu$ L di RW1 e centrifugati a 10000 rpm per 30". È stato scartato il residuo dal tubo e, dopo aver cambiato il tubo raccogliatore, sono stati aggiunti 500  $\mu$ L di RPE e centrifugati a 10000 rpm per 30". È stato scartato il residuo dal

tubo e sono stati aggiunti 500  $\mu\text{L}$  di RPE e centrifugati a 10000 rpm per 2 minuti. Successivamente è stato scartato il residuo dal tubo e centrifugato a 10000 per 2 minuti. E' stato sostituito il tubo raccoglitore con un eppendorf da 1.5 mL e sono stati aggiunti 30  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  RNAsi free. Dopo centrifugata a 10000 rpm per 1 minuto è stato ottenuto il 1° eluato. Al 1° eluato sono stati aggiunti prima 20  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  RNAsi free poi sono stati aggiunti 50  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  RNAsi free. Il 2° eluato è stato ottenuto dopo centrifugazione a 11400g per 1 minuto.

### 3.6.2 Quantificazione dell'RNA estratto e verifica della sua qualità

La quantificazione e la verifica della qualità dell'RNA estratto vengono effettuati attraverso un'analisi spettrofotometrica: i campioni vengono diluiti in acqua (1:50) e ne si valuta l'assorbanza (A) a lunghezze d'onda ( $\lambda$ ) 260 e 280 nm. La concentrazione dell'RNA estratto è ricavabile dalla formula:

$$[RNA]_{\text{ng}/\mu\text{L}} = (A_{260} - A_{280}) \times \text{fatt. di diluizione} \times \text{fatt. di conversione (40 per RNA)}$$

Il rapporto delle assorbanze 260:280, per l'RNA, deve essere compreso tra 1.8 e 2.0; valori superiori indicano una contaminazione da proteine.

### 3.6.3 Retrotrascrizione

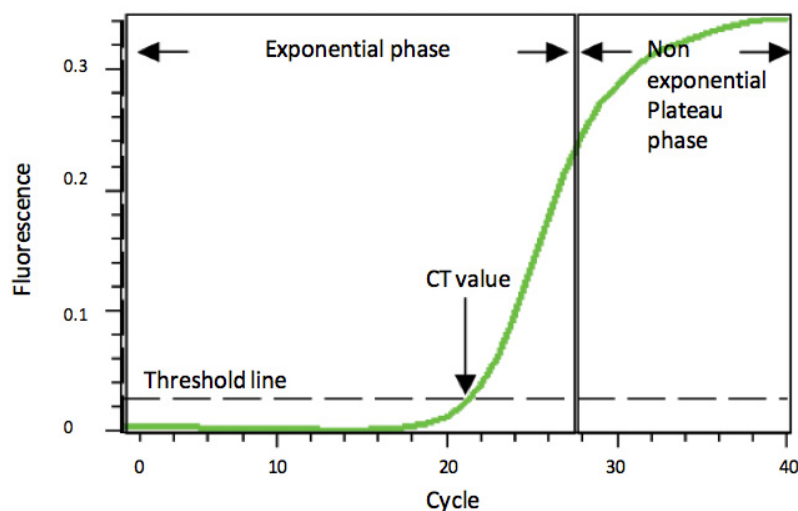
Per la retrotrascrizione in cDNA è stato utilizzato il kit commerciale *iScript* (Biorad). In una eppendorf sono stati messi 500 ng di RNA, 4  $\mu\text{L}$  di *iScript reaction mix*, 1  $\mu\text{L}$  di trascrittasi inversa *iScript* e 14.5  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  *nuclease-free*, per un volume totale di 20  $\mu\text{L}$ . Il protocollo della reazione di PCR prevede un'incubazione di 5 minuti a 25°C, seguiti da 30 minuti a 42°C, per poi concludere con 5 minuti a 85°C.

Terminato il processo di retrotrascrizione i campioni ottenuti possono quindi essere utilizzati subito o congelati a -20°C.

### 3.6.4 Real Time PCR con *SybrGreen*

La Real Time PCR è una tecnologia che permette la quantificazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione. La rilevazione dei prodotti di PCR è resa possibile misurando la fluorescenza di una molecola "reporter" la quale aumenta con l'accumularsi del prodotto di reazione.

L'analisi ci fornisce, per ogni campione, un valore di "Ciclo soglia" (Ct) che viene determinato nella fase esponenziale della reazione di amplificazione ed è il ciclo in cui si ha un segnale di fluorescenza 10 volte superiore al rumore di fondo (Figura 19). Il Ct è dipendente dal numero di copie iniziali di template ed è tanto più alto quanto minore è la concentrazione iniziale del template: la quantità iniziale di cDNA è quindi inversamente proporzionale al numero di cicli necessario per la rilevazione. La molecola reporter da noi utilizzata è il cromoforo *SybrGreen*, un intercalante la cui fluorescenza è 100 volte maggiore quando è legato al doppio filamento di DNA.



**Figura 19:** Grafico del segnale di amplificazione ottenuto dopo Real Time PCR.

Dal momento che il SYBR Green è un colorante aspecifico, per poter validare la misurazione è necessario che il prodotto dell'amplificazione sia rappresentato soltanto dall'amplificato del gene in esame. Per questo è necessario caratterizzare

il prodotto della PCR mediante l'analisi della temperatura di Melting ( $T_m$ ). Ogni frammento di DNA a doppio filamento si dissocia ad una caratteristica  $T_m$ , che è definita come la temperatura alla quale il 50% del DNA è a singolo filamento. Per determinare la temperatura di Melting, dopo l'amplificazione del DNA target si deve far eseguire al termociclatore una curva di Melting, in cui si monitora continuamente la fluorescenza in corrispondenza dell'aumento graduale della temperatura. Quando la temperatura della reazione raggiunge la  $T_m$  del frammento analizzato, la fluorescenza comincia a decadere velocemente fino a scomparire. L'analisi della curva di Melting permette quindi l'identificazione dei prodotti di amplificazione, ai quali è associata una precisa  $T_m$ , ed eventuali prodotti aspecifici.

Per la preparazione delle miscele di reazione, nel presente lavoro è stato utilizzato:

- 25  $\mu\text{L}$  di *Fluocycle H II SYBR*
- 1.5  $\mu\text{L}$  di ciascun primer (10  $\mu\text{M}$ ) per la  $\beta$ -actina, Puma, MDM2 e p21, le cui sequenze sono:

$\beta$ -Actina FOR: 5'-GCACTCTTCCAGCCTTCCTTCC- 3'

$\beta$ -Actina REV: 5'-GAGCCGCCGATCCACACG-3'

Puma FOR: 5'-GAGGAGGAACAGTGGGC-3'

Puma REV: 5'-CTAATTGGGCTCCATCTCGG-3'

MDM2 FOR: 5'-TCTAGGAGATTTGTTTGGCGT-3'

MDM2 REV: 5'-TCACAGATGTACCTGAGTCC-3'

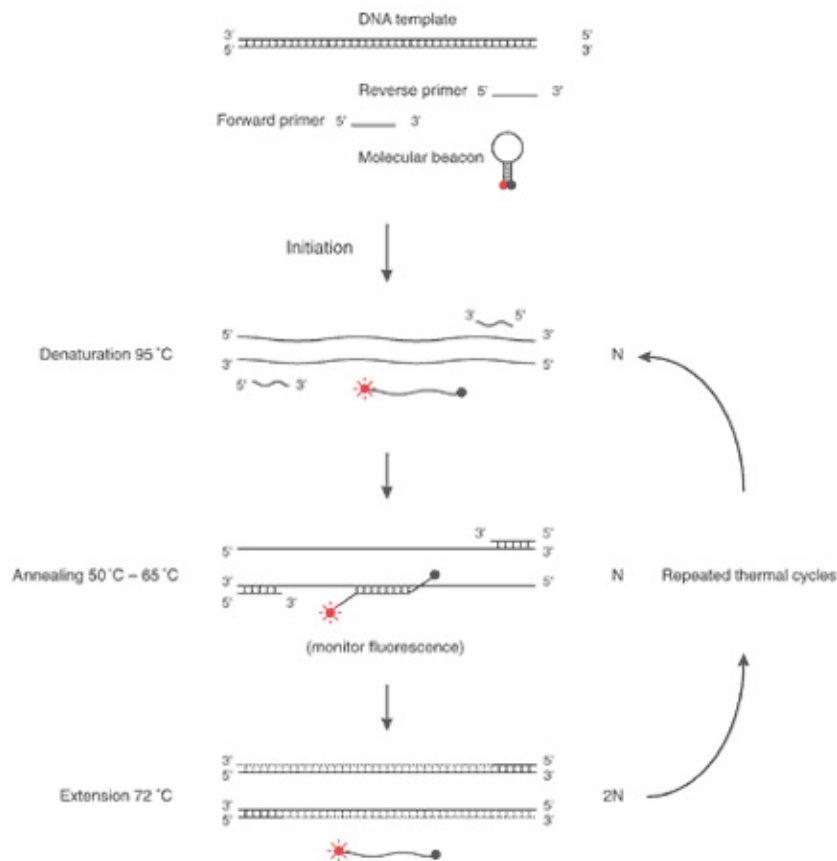
p21 FOR: 5'-TGCCGAAGTCAGTTCCTTG -3'

p21 REV: 5'-CATGGGTTCTGACGGACATC-3'

- 3  $\mu\text{L}$  di cDNA
- 19  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$

Mentre le temperature di denaturazione e di allungamento sono costanti nelle reazioni di PCR e corrispondono a 95°C e 72°C rispettivamente, la T di annealing varia secondo i primer utilizzati (Figura 20). Nel presente lavoro la T di annealing utilizzata per tutti i geni amplificati è di 55°C. Il ciclo di amplificazione effettuato prevede:

- una prima fase di denaturazione condotta a 95°C per 15 minuti;
- la fase ciclica di amplificazione (40 cicli) con le seguenti temperature: 98°C per 5 secondi, 55°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi;
- un ciclo di Melting a 95°C per 5 secondi, 40°C per 15 secondi e 95°C per 5 secondi;
- un ciclo di raffreddamento a 40°C per 30 secondi.



**Figura 20:** Schema delle fasi di una PCR.

Per ovviare ad eventuali differenze tra campioni nella quantità di RNA utilizzato e nell'efficienza di retrotrascrizione, il valore di espressione del gene bersaglio viene normalizzato rispetto al valore di un gene *housekeeping* ritenuto essere espresso allo stesso livello in tutti i campioni: a tale scopo è stata utilizzata come controllo interno la  $\beta$ -actina.

Sebbene la metodica permetta una quantificazione assoluta, ai fini dello studio è stata sufficiente una quantificazione relativa, mettendo a confronto l'espressione del gene bersaglio con quello del gene di riferimento, sia per i campioni trattati che per il campione calibratore (solo DMSO). Ciò è stato fatto con il metodo comparativo dei Ct (metodo  $\Delta\Delta Ct$ ) basato sulla formula:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target/trattato}} - Ct_{\text{housek./trattato}}) - (Ct_{\text{target/non trattato}} - Ct_{\text{housek./non trattato}})$$

Dove:

$Ct_{\text{target/trattato}}$  è il ciclo soglia del gene target nella condizione da testare.

$Ct_{\text{housek./trattato}}$  è il ciclo soglia del gene housekeeping nella condizione da testare.

$Ct_{\text{target/non trattato}}$  è il ciclo soglia del gene target nella condizione di riferimento (DMSO).

$Ct_{\text{housek./non trattato}}$  è il ciclo soglia del gene housekeeping nella condizione di riferimento (DMSO).

Il rapporto numerico tra l'espressione del gene bersaglio nella condizione di interesse e l'espressione dello stesso nella condizione di riferimento è ricavabile dalla formula:

$$\text{Rapporto espressione normalizzato} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

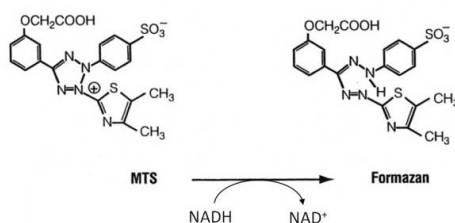
Il risultato ottenuto rappresenta il numero delle volte di aumento (o diminuzione) del gene bersaglio rispetto al gene calibratore al quale viene dato il valore 1. Normalizzare l'espressione del gene bersaglio a quella del gene di riferimento compensa la differenza nella quantità di campione.



### 3.7 Analisi della vitalità cellulare

Il saggio MTS è basato sulla capacità delle cellule vitali di metabolizzare, grazie alla succinato deidrogenasi mitocondriale, il sale giallo di tetrazolio (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*) (MTS), in presenza di fenazina metasulfonato (PMS) come accettore di elettroni, in formazano color porpora direttamente solubile nel mezzo di coltura. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e quindi all'attività metabolica e alla vitalità cellulare. Questo test fornisce un'indicazione relativa della popolazione vitale e permette di valutare la tossicità di una sostanza, attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare ottenuti dalle cellule trattate rispetto ai controlli.

*Procedura operativa:* Le cellule U87MG sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti ad una densità di 3000 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore è stato aspirato il mezzo e trattato ciascun pozzetto con 99  $\mu\text{L}$  di nuovo mezzo fresco e 1  $\mu\text{L}$  dei composti BE28, BE54 e BE 106 a differenti concentrazioni (10 nM-10  $\mu\text{M}$ ), a cui ha fatto seguito un'incubazione di 24 ore. Successivamente ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di MTS. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C, è stata effettuata una lettura spettrofotometrica a 490 nm con il lettore di piastre (*Victor Wallac 2, Perkin Elmer*). I risultati sono stati espressi come percentuale delle assorbanze del campione trattato rispetto al controllo non trattato. Negli studi concentrazione-dipendenza, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti dei composti; dalle percentuali dei trattati rispetto al controllo è stata quindi generata una curva sigmoide dose-risposta da cui sono stati poi ricavati i valori di  $\text{IC}_{50}$ . Ogni trattamento con i composti è stato effettuato in duplicato e i risultati ottenuti rappresentano la media  $\pm \text{SEM}$  di tre esperimenti indipendenti.



**Figura 21:** Riduzione di MTS a formazano rosso.

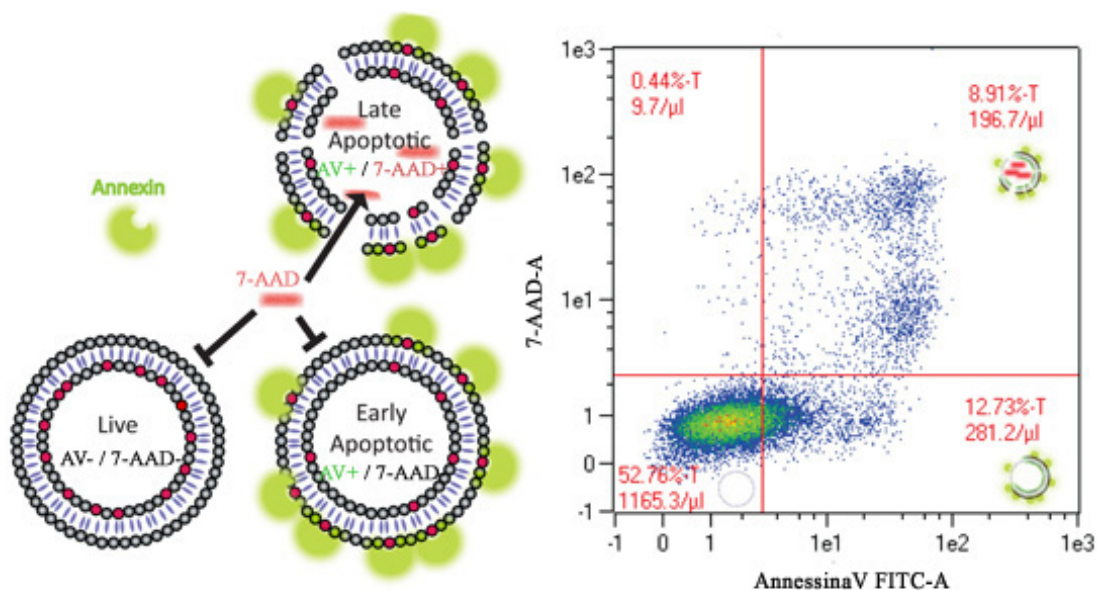
### 3.8 Determinazione del meccanismo di morte cellulare

Al fine di valutare se i composti inducessero apoptosi cellulare, è stato allestito il saggio dell'Annexina V/7-AAD: tale saggio ha permesso di valutare l'attivazione del processo apoptotico nelle cellule U87MG, in seguito al loro trattamento per tempi crescenti con le molecole in studio.

Durante l'apoptosi la cellula subisce la traslocazione del fosfolipide di membrana Fosfatidilserina (PS) dal lato interno della membrana, dove normalmente è localizzato, a quello esterno. L'Annexina V è una proteina che si lega con elevata affinità e specificità alla PS. E' possibile quindi utilizzare l'Annexina V marcata con un fluoroforo (FITC) come sonda sensibile per rilevare l'esposizione della PS sulla superficie cellulare ed individuare la frazione di cellule in apoptosi all'interno della popolazione totale. Anche nelle cellule in necrosi la PS è accessibile alla marcatura a causa della perdita di integrità della membrana plasmatica. Tuttavia l'utilizzo di 7-Aminoactinomomicina (7-AAD) permette di distinguere le cellule necrotiche da quelle apoptotiche: questo colorante fluorescente è un intercalante del DNA capace di penetrare all'interno delle cellule solo quando viene meno l'integrità della membrana citoplasmatica. Di conseguenza mentre le cellule necrotiche risultano positive alla colorazione con 7-AAD, le cellule in apoptosi, la cui membrana è ancora integra, risulteranno negative.

Quindi grazie alla combinazione di Annexina V e 7-AAD è possibile ottenere un profilo citofluorimetrico dove le cellule vitali risultano negative ad entrambi i markers, quelle in apoptosi risultano positive all'Annexina V e negative a 7-AAD mentre quelle necrotiche sono positive per entrambi i marcatori.

*Procedura operativa:* La doppia colorazione con Annexina V, marcata con fluoresceina-isotiocianato (FITC), e 7-Aminoactinomomicina (7-AAD) è stata condotta utilizzando il kit commerciale *Muse Annexin V and Dead Cell Kit* (Merck Millipore). Le cellule sono state trattate con DMSO (controllo), Nutlina-3 (10  $\mu$ M) o con i composti BE8 e BE28 (5  $\mu$ M) per 4-16-24 ore; sono state poi raccolte, centrifugate a 300g per 5 minuti e risospese in mezzo di coltura. Una aliquota di 100  $\mu$ L di sospensione è stata addizionata a 100  $\mu$ L di reagente fluorescente e



**Figura 22: Saggio dell'Annexina V/7-AAD.** Nella figura di sinistra è illustrato schematicamente il principio di funzionamento del saggio. La figura di destra presenta un esempio di profilo citofluorimetrico ottenuto dall'analisi della fluorescenza emessa dai due marker. (Adattato da <http://www.stmichaelshospital.com>)

incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. La percentuale di cellule vive, apoptotiche e necrotiche è stata acquisita e analizzata tramite *Muse Cell Analyzer* (Merck Millipore).

## Capitolo 4

# Risultati e discussione

In questo lavoro di tesi sono stati saggiati 21 diversi composti a struttura fenil-indol-gliossilammidica (PIGA), sintetizzati presso i Dipartimenti di Farmacia dell'Università di Napoli Federico II e dell'Università di Pisa. Con lo scopo di ottenere ligandi diretti sia verso il TSPO che la proteina MDM2, sono stati condotti studi di modeling molecolare in modo da individuare tra i molteplici ligandi noti al TSPO quelli che, adeguatamente sostituiti, potessero efficacemente interferire nell'interazione p53/MDM2. La scelta si è quindi orientata su molecole a struttura fenil-indol-gliossilammidica, il cui nucleo è considerato un valido *scaffold* per l'interazione con il TSPO: in base ai dati cristallografici sulle modalità di interazione p53/MDM2 e alle informazioni su inibitori già presenti in letteratura, si è proseguito con le modificazioni alle catene laterali, in modo da mimare efficacemente il dominio di transattivazione di p53, fondamentale per l'interazione con MDM2. Successivi studi di docking hanno dimostrato la correttezza delle ipotesi avanzate nella fase di modellazione.

La linea cellulare U87MG utilizzata in questo lavoro è una linea umana adesa di glioblastoma, derivata da un glioma maligno di grado III, con morfologia epiteliale: essa mantiene p53 con sequenza amminoacidica *wild type* e sovraesprime TSPO e MDM2. Il principale meccanismo che è alla base dell'aumentata espressione di MDM2 nelle cellule U87MG consiste nella mancanza di una proteina citoplasmatica, chiamata PTEN, che in condizioni normali contrasta l'eccessivo accumulo di

MDM2 nel nucleo. Questa linea cellulare può essere considerata un buon modello di studio rappresentativo di GBM in quanto fino all'80% dei casi di GBM è stata riscontrata la mancanza del locus genico per PTEN e una aumentata espressione della proteina Traslocatrice TSPO. Inoltre, le cellule U87MG mostrano un efficiente sistema di riparazione del DNA, il quale è associato a proliferazione cellulare aberrante e resistenza alla terapia genotossica convenzionale per il GBM.

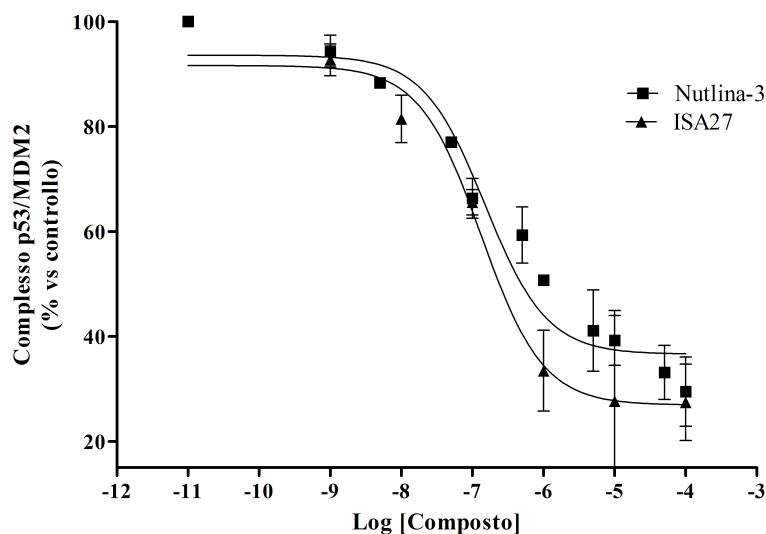
Tutti i trattamenti alle colture di cellule tumorali con i composti di nuova sintesi della serie BE sono sempre stati eseguiti in parallelo con due composti già caratterizzati: la Nutlina-3, che risulta inibire l'interazione p53-MDM2, e PK11195, ligando classico al TSPO. I risultati così ottenuti in seguito ai trattamenti con i composti di nuova sintesi sono stati confrontati con quelli dei trattamenti con le molecole standard, al fine di avere un riferimento dell'efficacia dei composti di nuova sintesi.

## 4.1 Dissociazione del complesso p53/MDM2 nel sistema *cell-free*

Come primo step è stata valutata la capacità delle molecole di nuova sintesi di dissociare il complesso p53/MDM2 nativo umano. È stato quindi allestito un saggio ELISA quantitativo su lisato cellulare ottenuto da cellule U87MG: tale tecnica ha permesso una rapida ed efficiente quantificazione dell'interazione p53/MDM2 nel sistema *cell-free*.

Come riportato nel capitolo dei Metodi, sono stati condotti esperimenti preliminari per la validazione del saggio, utilizzando concentrazioni crescenti di lisato cellulare e di complesso ricombinante p53/MDM2: i risultati ottenuti hanno consentito di valutare la proteina-dipendenza del saggio e di allestire una curva semi-quantitativa per il complesso preso in esame.

Nutlina-3 e ISA27, due inibitori di MDM2 ampiamente studiati e caratterizzati, sono stati utilizzati come composti di riferimento. Come riportato in Figura 23, sia Nutlina-3 che ISA27 provocano la dissociazione del complesso p53/MDM2, con valori di  $IC_{50}$  di  $108.0 \pm 4.5$  nM e  $121.7 \pm 14.5$  nM, rispettivamente: tali risultati sono comparabili a quelli ottenuti con tecniche immuno-enzimatiche affini e che sono già riportati in letteratura.



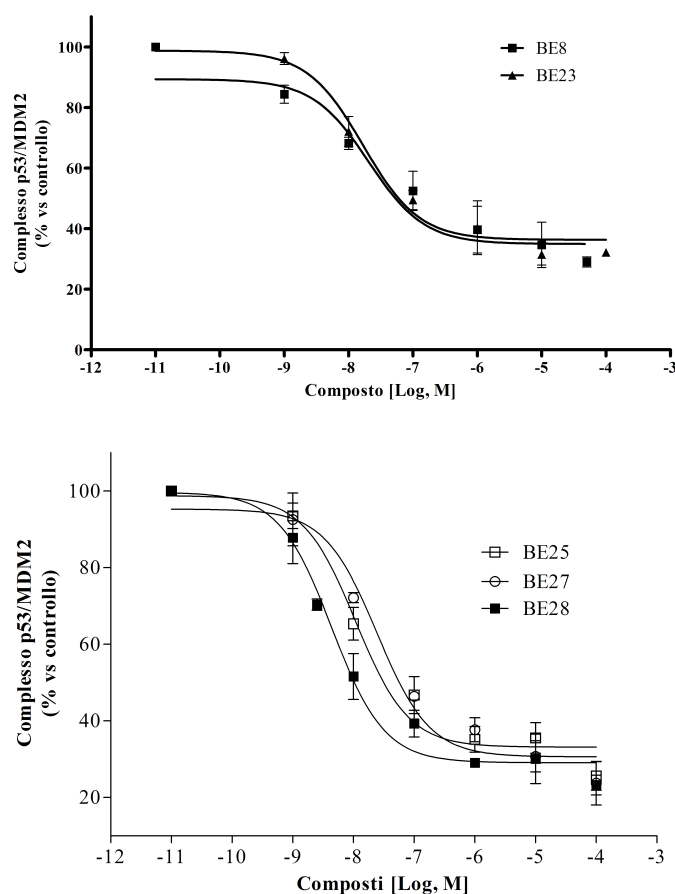
**Figura 23:** Dissociazione del complesso dopo trattamento con i composti di riferimento. I valori sono espressi come % rispetto al controllo (100%) e rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti.

I 21 composti in studio sono stati quindi saggiati con il metodo ELISA precedentemente validato: i valori di  $IC_{50}$  sono riportati nelle tabelle di Figura 24.

Composti	IC50 (nM)	Composti	IC50 (nM)
BE8	11.65 $\pm$ 0.49	BE20	2440 $\pm$ 288
BE10	1128 $\pm$ 140	BE21	1309 $\pm$ 281
BE11	568 $\pm$ 83	BE22	1130 $\pm$ 60
BE12	983 $\pm$ 98	BE23	15.2 $\pm$ 1.9
BE14	852 $\pm$ 90	BE24	77.7 $\pm$ 10.5
BE15	797 $\pm$ 78	BE25	9.7 $\pm$ 1.2
BE16	834 $\pm$ 90	BE26	154.6 $\pm$ 0.8
BE17	833 $\pm$ 59	BE27	24.8 $\pm$ 2.7
BE18	706 $\pm$ 85	BE28	4.3 $\pm$ 0.6
BE19	202 $\pm$ 21.2	BE29	n.a.
		BE30	n.a.

**Figura 24:** Effetti dei nuovi composti sulla dissociazione del complesso nativo p53/MDM2. Concentrazione (nM) inibente il 50% del complesso. I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti.

I risultati ottenuti hanno permesso di individuare, all'interno del pool dei composti in studio, quelli dotati del profilo migliore in termini di inibizione di MDM2: sono stati quindi selezionati BE8, BE23, BE25, BE27 e BE28. Essi hanno mostrato una ottima capacità di dissociare il complesso p53/MDM2, con valori di  $IC_{50}$  nell'ordine del nanomolare: complessivamente sono dotati di una potenza da 5 a 10 volte maggiore rispetto ai composti di riferimento Nutlina-3 e ISA27. In Figura 25 sono riportate le curve di inibizione per i composti selezionati.



**Figura 25: Saggio ELISA per la valutazione dell'interazione p53/MDM2.** I lisati cellulari di U87MG, contenenti il complesso nativo p53/MDM2, sono stati incubati con DMSO (controllo) o con diverse concentrazioni dei composti in esame. Al termine dei trattamenti, i lisati sono stati incubati nei pozzetti di un multiwell da 96, dove vi è stato precedentemente preparato un coating con l'anticorpo anti-MDM2. Dopo ripetuti lavaggi, i livelli di p53/MDM2 sono stati quantificati usando un anticorpo primario specifico anti-p53 e conseguentemente un anticorpo coniugato con HRP. I bianchi sono stati ottenuti in assenza di anticorpo primario. I valori sono espressi come % rispetto al controllo (100%) e rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti.

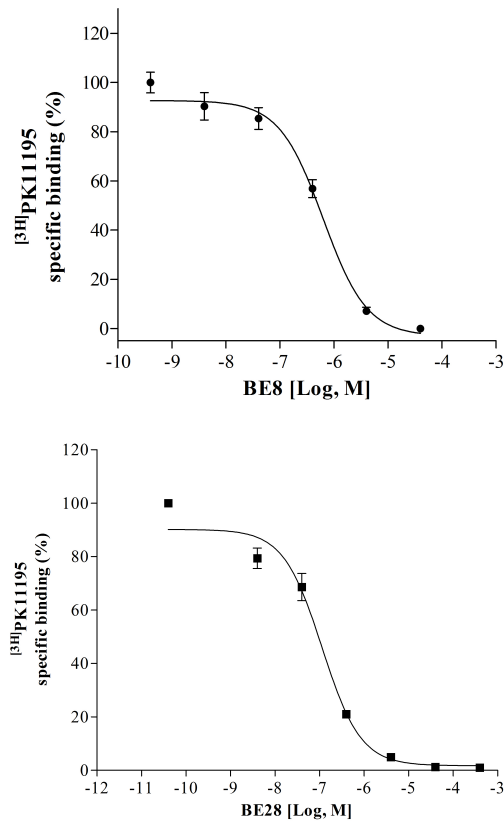


## 4.2 Affinità di legame dei nuovi composti verso il Traslocatore proteico TSPO

I cinque composti che hanno dimostrato la maggiore potenza di inibizione verso MDM2, sono stati in seguito sottoposti a studi di binding competitivo con ligando radiomarcato, in modo da valutare la capacità di legare la proteina Traslocatrice TSPO. A questo scopo si è allestito un saggio di binding con il ligando radiomarcato [ $^3\text{H}$ ]-PK11195, eseguito su membrane mitocondriali di rene di ratto. I risultati dell'esperimento mostrano come i composti in esame riescano a spiazzare il radioligando in maniera concentrazione-dipendente con valori di  $K_i$  nell'ordine del nanomolare, paragonabili a quelli del composto di riferimento PK11195. Di seguito sono presentati i valori di  $K_i$  ottenuti dalla  $\text{IC}_{50}$  di ciascun composto (non riportata), tramite l'equazione di Cheng-Prusoff.

Composti	$K_i$ (nM)
BE8	$438 \pm 35$
BE23	$783 \pm 60$
BE25	$1004 \pm 85$
BE27	$365 \pm 30$
BE28	$87.2 \pm 6.8$

I composti BE8 e BE28, alla luce dei dati di spiazzamento del [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 e di dissociazione sul complesso p53/MDM2, si sono rivelati le molecole più promettenti per il dual-targeting oggetto di studio; tali composti sono stati quindi selezionati per i successivi saggi, i cui risultati verranno in seguito esposti. Le curve di spiazzamento del [ $^3\text{H}$ ]-PK11195 da parte di BE8 e BE28 sono mostrate nella Figura 4.2.

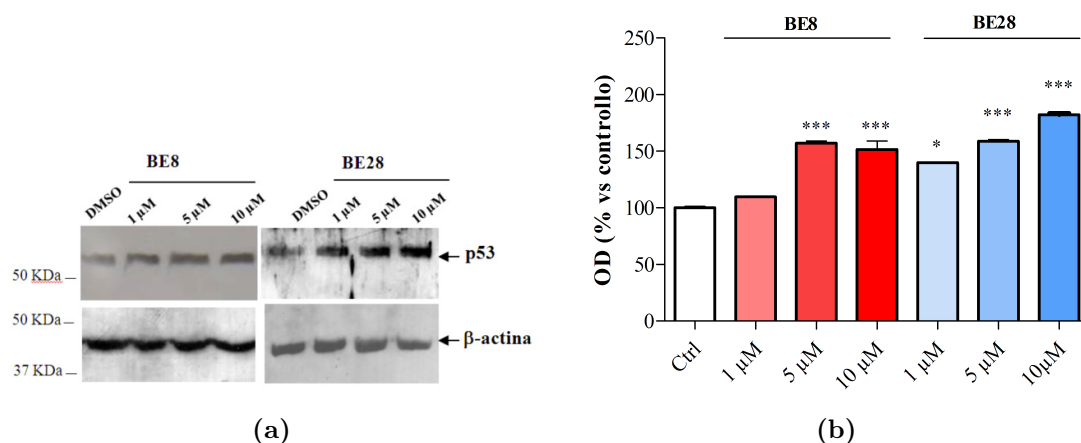


**Figura 26:** Grafici di spiazzamento di  $[^3\text{H}]\text{-PK11195}$  L'omogenato, costituito da membrane mitocondriali ottenute da rene di ratto ( $20\text{ }\mu\text{g}$  di proteine), è stato incubato con  $[^3\text{H}]\text{-PK11195}$   $0.6\text{ nM}$  e concentrazioni crescenti di composto in esame. Raggiunto l'equilibrio, i campioni sono stati filtrati e la radioattività legata è stata quantificata tramite contatore a scintillazione liquida. I valori sono espressi come percentuale di binding specifico contro il valore basale (impostato a 100%) e rappresenta la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti.

### 4.3 Stabilizzazione e riattivazione del pathway di p53

Una volta accertata la capacità di dissociazione del complesso p53/MDM2 da parte di BE8 e BE28, si è proseguito alla valutazione di alcuni comuni parametri in grado di rivelare la riattivazione del pathway intracellulare di p53. È noto come l'utilizzo di inibitori di MDM2 promuova l'aumento dei livelli della proteina p53 intracellulare; la sua stabilizzazione potrebbe però essere attribuibile anche ad una intensificata trascrizione del gene di p53, con conseguente aumento della traduzione in proteina. Alcuni studi hanno quindi dimostrato come l'accumulo di p53, in seguito al trattamento con inibitori MDM2, sia effettivamente attribuibile alla diminuita interazione p53/MDM2, piuttosto che all'aumentata espressione della proteina, soprattutto per tempi brevi di trattamento (Costa et al., 2013).

Alla luce di queste considerazioni, i livelli intracellulari di p53 sono stati valutati dopo trattamento per 12 ore con i composti BE8 e BE28. A tale scopo è stato allestito un esperimento di Western blotting su cellule U87MG: come precedentemente riportato, la linea cellulare è caratterizzata da bassi livelli di espressione della proteina p53 *wild-type*, dovuti in parte ad una espressione amplificata del suo regolatore negativo MDM2.



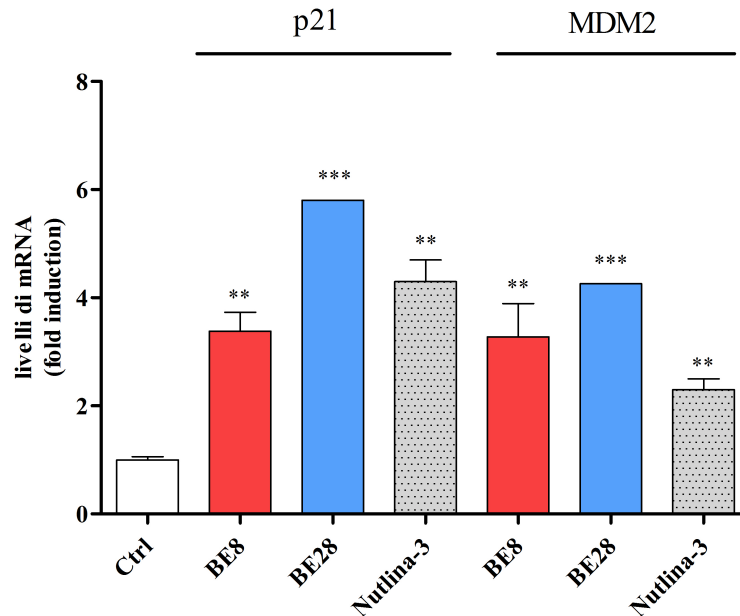
**Figura 27: Analisi Western blot sui livelli di p53.** Le cellule U87MG sono state trattate con DMSO (controllo) o con i composti BE8 e BE28 alle concentrazioni indicate. I lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi western-blotting utilizzando un anticorpo anti-p53. Nel pannello A sono mostrate le immagini rappresentative di Western blot. Il grafico a barre (pannello B) mostra l'analisi densitometrica eseguita tramite il software ImageJ. I risultati sono espressi come percentuale di OD rispetto al controllo (100%) e rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti. La significatività statistica è stata determinata tramite il test Anova ad una via, a cui ha fatto seguito il test Bonferroni: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$  rispetto al controllo.

Nella Figura 27-a sono riportate le immagini relative all'analisi Western Blot dei lisati cellulari, in cui è evidente che l'anticorpo anti-p53 riconosce, una sola banda di circa 55 KDa, corrispondente alla p53. In Figura 27-b sono riportate le immagini relative all'analisi densitometrica delle bande immunoreattive, ottenute tramite il programma Image J. L'incubazione delle cellule U87MG con i composti BE8 e BE28 per 12 ore ha causato un aumento dose-dipendente di p53, così come mostrato in Figura 27.

L'accumulo di p53 risulta significativo rispetto al controllo a partire da 5  $\mu$ M per BE8 e da 1  $\mu$ M per BE28.

Per confermare la riattivazione del pathway di p53 in seguito a trattamento con inibitori di MDM2, sono stati valutati i parametri di espressione dei geni bersaglio di p53: attraverso la Real time RT-PCR, è stato possibile quantificare l'mRNA dei principali geni target di p53, MDM2 e p21, in seguito al trattamento delle cellule U87MG con BE8 e BE28. I risultati a 8 ore, riportati in Figura 28, mostrano un incremento significativo dei livelli di trascritto di MDM2 e p21. Il composto BE8

ha una capacità di indurre la trascrizione dei geni target paragonabile a quella del composto di riferimento Nutlina-3, con un fattore di induzione di 3.4 (p21) e 3.2 (MDM2) rispetto al controllo. Il composto BE28 mostra una spiccata capacità di indurre la trascrizione di p21 (5.8 volte rispetto al controllo), assestandosi su valori paragonabili a quelli degli altri due composti per quanto riguarda l'induzione della trascrizione di MDM2. I risultati dei due esperimenti suggeriscono una diretta correlazione tra la stabilizzazione dei livelli di p53 e l'attivazione della sua pathway: tale relazione è evidenziata dall'aumento dei livelli di trascritto dei geni target p21 e MDM2, in seguito al trattamento con entrambi i composti in studio.



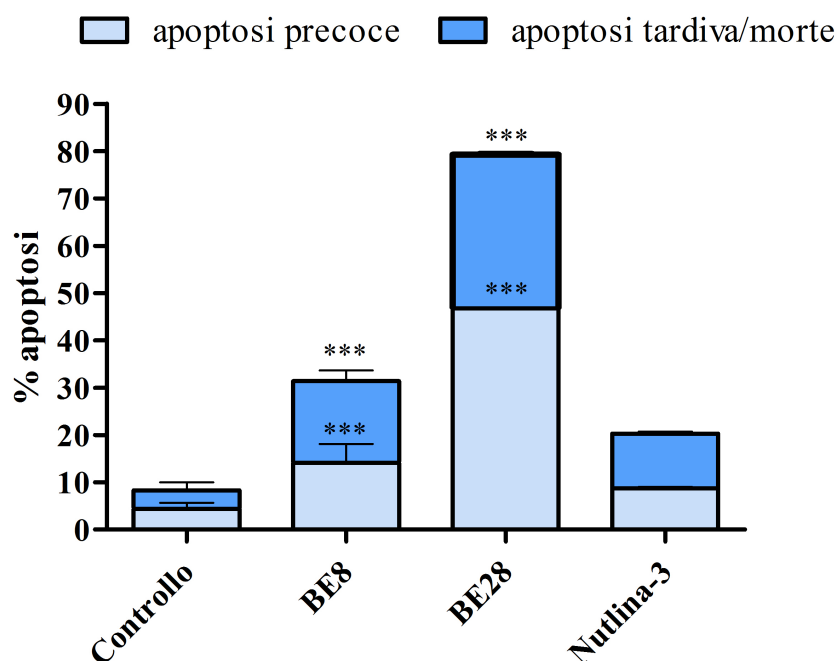
**Figura 28: Quantificazione relativa dell'mRNA di geni target di p53.** La quantificazione relativa dei geni target p21 e MDM2 è stata eseguita mediante Real time RT-PCR, come riportati nei Metodi. I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti. Ciascun esperimento è stato condotto in duplicato. La significatività statistica è stata determinata tramite il test Anova ad una via, a cui ha fatto seguito il test Bonferroni: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  rispetto al controllo.

## 4.4 Attivazione dell'apoptosi in cellule U87MG

La capacità dei composti BE8 e BE28 di indurre apoptosi in cellule U87MG è stata valutata mediante il saggio dell'Annessina V/7-AAD. L'utilizzo di Annessina marcata con FITC ha consentito di individuare la frazione di cellule che esponeva sulla membrana esterna la fosfatidilserina: poichè tale evento si manifesta nelle fasi iniziali dell'apoptosi, il saggio ha permesso di valutare l'induzione di morte apoptotica già a partire dalle prime ore di incubazione con i composti.

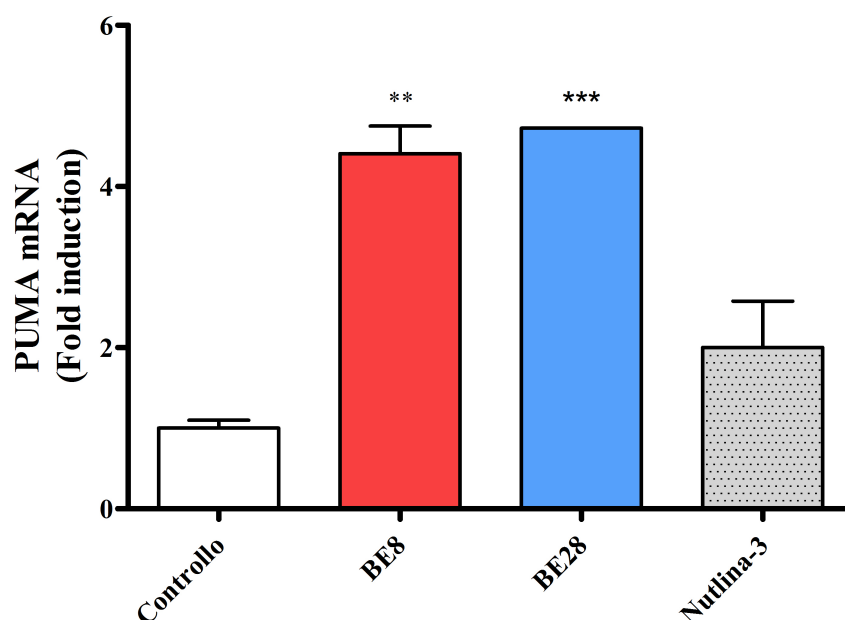
I risultati ottenuti dal trattamento delle cellule U87MG con i composti BE8 e BE28 ( $5\ \mu\text{M}$ ) sono esposti in Figura 29. Nelle cellule non trattate si misura una percentuale di apoptosi sempre inferiore al 10%, in linea con l'attesa quantità di apoptosi spontanea in coltura. Per quanto riguarda i campioni trattati, appare evidente come entrambi i composti abbiano indotto, dopo 24 ore, una significativa esternalizzazione della fosfatidilserina, sia in assenza (fase apoptotica precoce) che in presenza del segnale della 7-AAD (tarda apoptosi/necrosi). In particolare il composto BE 28 dimostra una spiccata capacità di attivazione del meccanismo apoptotico, con percentuali di cellule in fase apoptotica precoce intorno al 47% già dopo 24 ore. Inoltre è importante sottolineare come l'inibitore di MDM2 Nutlina-3, utilizzato come riferimento, non mostri dati significativi nell'induzione di apoptosi nelle 24 ore successive al trattamento.

L'analisi dei dati ottenuti fornisce un interessante quadro sull'azione di BE8 e BE28: i due composti selezionati inducono apoptosi in misura differente rispetto a quanto osservato per l'inibitore di riferimento Nutlina-3. Questi risultati supportano quindi l'ipotesi secondo cui i nuovi composti possono innescare pathway intracellulari alternativi rispetto ad un agente come Nutlina-3, specificatamente attivo verso l'interazione p53/MDM2.



**Figura 29: Esame delle cellule apoptotiche.** Le cellule U87MG sono state trattate con 5  $\mu$ L di BE8, BE28 o 10  $\mu$ L di Nutlina-3 per 24 ore. Dopo incubazione le cellule sono state raccolte ed è stata valutata l'esternalizzazione della fosfatidilserina utilizzando il protocollo sperimentale riportato nei Metodi. I risultati sono riportati come percentuale di cellule apoptotiche rispetto alla totalità della popolazione cellulare. In celeste è riportata la percentuale di cellule in uno stadio di apoptosi precoce; le cellule in fase avanzata o necrotiche sono indicate in blu. I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti. La significatività statistica è stata determinata tramite il test Anova ad una via, a cui ha fatto seguito il test Bonferroni: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  rispetto al controllo.

I risultati ottenuti dal saggio dell'Annessina V sono stati supportati e confermati da un esperimento di real time PCR: il saggio ha avuto lo scopo di quantificare i livelli di mRNA del gene pro-apoptotico PUMA, la cui trascrizione è attivata dalla proteina p53. I risultati a 8 ore, riportati in Figura 30, mostrano un incremento della quantità di trascritto del gene PUMA nelle cellule trattate con BE8 e BE28: rispetto al controllo basale, si osserva un aumento dei livelli di mRNA di 4-5 volte, contro un valore di circa 2 misurato nelle cellule trattate con il riferimento Nutlina-3. I dati sopra esposti confermano e rilanciano l'ipotesi formulata precedentemente, secondo cui i due composti studiati possano attivare pathway intracellulari alternativi rispetto a quanto fatto da Nutlina-3.



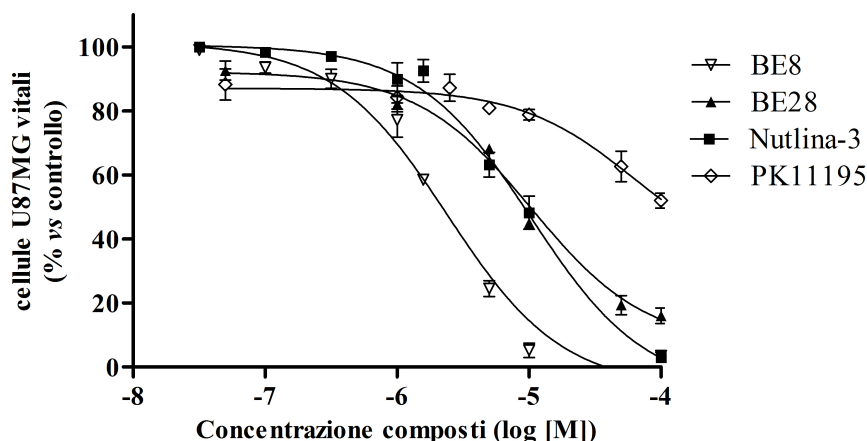
**Figura 30: Quantificazione relativa dell'mRNA di PUMA.** Le cellule U87MG sono state trattate con i composti BE8, BE28 o Nutlina-3 (5  $\mu$ M) per un tempo di 8 ore. La quantificazione relativa dell'mRNA è stata effettuata mediante real time PCR così come descritto nei Metodi. I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti, condotti ciascuno in duplicato. La significatività statistica è stata determinata tramite il test Anova ad una via, a cui ha fatto seguito il test Bonferroni: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  rispetto al controllo.



## 4.5 Analisi della vitalità cellulare

Poiché la crescita e la sopravvivenza cellulare rappresentano due parametri potenzialmente regolati sia dalla proteina p53 che dal TSPO, è stata valutata la capacità dei composti BE8 e BE28 di interferire in tali processi; i risultati ottenuti con i due composti sono stati confrontati con quelli ottenuti dai composti single-target di riferimento, Nutlina-3 e PK11195. A tale scopo le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti (10 nM - 10  $\mu$ M) di BE8, BE28, Nutlina-3 e PK11195, per un tempo di 24 ore. Al termine del periodo di incubazione è stato eseguito il test MTS per valutare il grado di proliferazione cellulare, così come riportato nei Metodi.

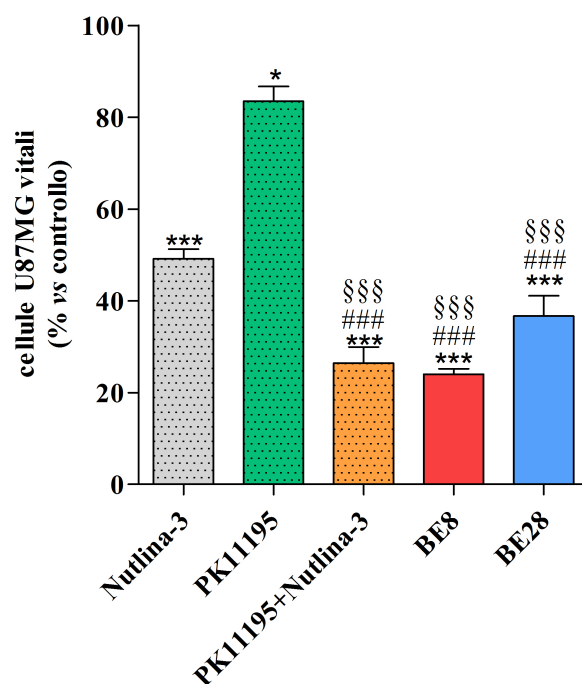
Le risultanti curve dose-risposta, il cui grafico è riportato in Figura 31, hanno permesso di ricavare le concentrazioni dei composti in grado di inibire il 50% della crescita/sopravvivenza delle cellule U87MG (IC<sub>50</sub>). I risultati mostrano come i composti BE8 e BE28 provochino un effetto inibitorio sulla crescita cellulare in maniera dose-dipendente, con valori di IC<sub>50</sub> di  $2.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$  e  $10.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , rispettivamente. Nutlina-3 causa una riduzione dose-dipendente paragonabile a BE28, mentre PK11195 ha un effetto inibitorio significativo a partire da 10  $\mu\text{M}$ , raggiungendo la massima inibizione alla concentrazione di 100  $\mu\text{M}$  ( $52.0 \pm 2.3 \%$  rispetto al controllo).



**Figura 31: Valutazione dell'effetto antiproliferativo su cellule U87MG.** Le cellule U87MG sono state trattate per 24 ore con concentrazioni crescenti (10 nM - 10  $\mu$ M) dei composti riportati. Le cellule vitali sono state poi contate attraverso il test MTS. I dati sono espressi come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo (non trattato). I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti, condotti ciascuno in duplicato. La significatività statistica è stata determinata tramite il test Anova ad una via, a cui ha fatto seguito il test Bonferroni: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  rispetto al controllo.

Al fine di confrontare il grado di sopravvivenza e di proliferazione cellulare in seguito ai diversi trattamenti, è stato effettuato un secondo screening in cui le cellule sono state trattate ad un'unica concentrazione di composto (10  $\mu$ M) per 24 ore.

Le cellule vive sono state quantificate attraverso il saggio di vitalità cellulare MTS, il cui allestimento è riportato nei Metodi. I risultati di questa analisi sono mostrati in Figura 32. L'effetto dei composti sulla vitalità cellulare è stato espresso come percentuale di cellule vive rispetto alle cellule vive del controllo, alle quali è stato attribuito un valore pari al 100%. Il composto BE8 si è rivelato il più efficace nel ridurre il numero di cellule vitali, portando a valori del 22% la quota residua di cellule sopravvissute. Il composto BE28, alla concentrazione di 10  $\mu$ M, provoca una diminuzione meno drastica della proliferazione cellulare, con percentuali rispetto alle cellule di controllo intorno al 35%.



**Figura 32: Valutazione dell'effetto antiproliferativo su cellule U87MG.** Le cellule U87MG sono state trattate con i composti in studio, Nutlina-3, PK11195 e Nutlina-3 + PK11195, alla concentrazione di 10  $\mu$ M. Le cellule vitali sono state contate dopo 24 ore di trattamento attraverso il saggio MTS. I dati sono espressi come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo (non trattato). I valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti distinti, condotti ciascuno in duplicato. La significatività statistica è stata determinata tramite il test Anova ad una via, a cui ha fatto seguito il test Bonferroni: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  rispetto al controllo; §§§  $< 0.001$  rispetto al solo PK11195; ###  $< 0.001$  rispetto alla sola Nutlina-3.

I campioni trattati con BE8 e BE28 hanno mostrato un'alta percentuale di inibizione della vitalità cellulare, significativamente maggiore rispetto a quella provocata dai composti PK11195 e Nutlina-3 utilizzati singolarmente. Il co-trattamento delle cellule con i due composti di riferimento produce un marcato effetto additivo sull'inibizione della proliferazione cellulare, con percentuali di morte cellulare paragonabili a quelle ottenute con i composti in studio. Questi dati dimostrano quindi come la simultanea attivazione di p53 e TSPO risulti essere vantaggiosa nel contrastare la proliferazione in cellule tumorali; inoltre, poiché il co-trattamento PK11195 + Nutlina-3 ha prodotto risultati comparabili con quelli di BE8 e BE28, è plausibile ritenere confermata la capacità dei due composti di agire come ligandi dual-target.

# Capitolo 5

## Conclusioni

Il glioblastoma multiforme rappresenta il tumore più comune e maligno tra le neoplasie del sistema nervoso centrale. Dato l'alto grado di malignità e la rapida insorgenza di resistenza ai comuni trattamenti farmacologici, l'aspettativa di vita per i pazienti affetti da GBM rimane molto bassa. L'attuale scarsità di cure efficaci contro il GBM ha indirizzato la ricerca verso nuove strategie terapeutiche, quali la terapia multi-target. La carcinogenesi infatti è un processo multifattoriale e multigenico caratterizzato dalla de-regolazione di molteplici vie di segnalazione intracellulare. Un approccio farmacologico impostato sul targeting di più bersagli molecolari può quindi rappresentare una valida strategia per il GBM. In particolare, agenti pro-apoptotici che agiscono sul pathway di morte mitocondriale rappresentano un incoraggiante campo di sviluppo per nuovi farmaci.

Un esempio di strategia multi-target applicata al GBM è rappresentato dagli inibitori duali PI3K/mTOR, che stanno emergendo come promettenti agenti terapeutici. Sono stati sviluppati diversi composti diretti verso queste due chinasi: la molecola XL765, per esempio, ha dimostrato una marcata diminuzione della proliferazione cellulare in vitro, così come una possibile efficacia in co-terapia con Temozolamide (Sami and Karsy, 2013).

In questo lavoro di tesi la proteina Traslocatrice TSPO e la proteina p53 sono state analizzate come possibile bersaglio di terapia multi-target: nonostante numerosi studi abbiano identificato nel TSPO e nel complesso p53/MDM2 due validi

target per il trattamento del glioblastoma multiforme, non sono state riportate in letteratura molecole in grado di interagire in modo combinato su entrambi i sistemi.

Si è quindi proceduto ad una valutazione biologica di molecole a struttura fenil-indol-gliossilammidica variamente sostituite, precedentemente modellizzate e sintetizzate presso i Dipartimenti di Farmacia dell'Università di Napoli Federico II e dell'Università di Pisa. In prima analisi è stata valutata la loro capacità di interagire con il TSPO e riattivare p53, attraverso la dissociazione dal suo inibitore MDM2. I risultati hanno mostrato che alcuni dei ligandi capaci di dissociare il complesso p53/MDM2 erano anche in grado di spiazzare il ligando classico al TSPO  $^3\text{H}$ PK11195, durante esperimenti di radiobinding. I due composti che hanno mostrato il miglior profilo sia in termini di affinità di legame al TSPO, sia nella capacità di dissociazione del complesso p53/MDM2, sono stati selezionati e sottoposti a ulteriori studi. I risultati ottenuti sono brevemente riportati di seguito:

- Sono stati valutati i parametri cellulari che sottostanno alla riattivazione del pathway di p53: l'incubazione delle cellule di glioblastoma umano con i composti BE8 e BE28 ha prodotto un aumento dose-dipendente dei livelli di p53 (dovuto ad una diminuita interazione con MDM2) e la riattivazione delle sue funzioni, come dimostrato dall'aumento dei trascritti dei geni target p21 e MDM2.
- I composti BE8 e BE28 inducono morte apoptotica, così come la trascrizione del gene pro-apoptotico PUMA, in misura differente rispetto a quanto osservato per l'inibitore di riferimento Nutlina-3. Questi risultati supportano quindi l'ipotesi secondo cui i nuovi composti possono innescare pathway intracellulari alternativi rispetto ad un agente come Nutlina-3, specificatamente ed esclusivamente attivo verso l'interazione p53/MDM2.
- Gli studi sulla vitalità cellulare hanno rivelato come BE8 e BE28 siano dotati di un effetto inibitorio sulla sopravvivenza cellulare maggiore rispetto ai composti di riferimento Nutlina-3 e PK11195 utilizzati singolarmente; ciò suggerisce quindi che le molecole di studio siano coinvolte nell'attivazione

di vie intracellulari diverse o alternative rispetto ai singoli composti di riferimento. Sorprendentemente le percentuali di sopravvivenza cellulare dopo trattamento con i composti BE divengono paragonabili a quelle ottenute dalla co-somministrazione di Nutlina-3 e PK11195: tale osservazione suggerisce ragionevolmente la simultanea attivazione di p53 e TSPO da parte dei due ligandi dual-target.

In conclusione, i due nuovi ligandi dual-target si sono rivelati dei buoni composti lead per ulteriori sviluppi futuri. L'uso di singole molecole a doppio target rappresenta infatti un promettente approccio per il trattamento del glioblastoma multiforme; ciò risulta avvalorato dal fatto che la maggioranza dei fenotipi di GBM conserva la proteina p53 *wild-type* e sovraesprime TSPO e MDM2. Le prospettive di sviluppo futuro sono però imprescindibili dall'ulteriore delucidazione dei meccanismi molecolari alla base dell'azione di questi sistemi: il continuo studio dei segnali intracellulari coinvolti nei processi di proliferazione cellulare e apoptosi può infatti consentire di ottimizzare la simultanea affinità sui diversi target da parte dei ligandi di sintesi, nonché favorire la scoperta di nuovi bersagli molecolari.

# Bibliografia

- Arora, A., Gera, S., Maheshwari, T., Raghav, D., Alam, M., Singh, R., and Agarwal, S. (2013). The dynamics of stress p53-mdm2 network regulated by p300 and hdac1. *PLoS ONE*, 8(2).
- Austin, C. J., Kahlert, J., Kassiou, M., and Rendina, L. M. (2013). The translocator protein (tspo): A novel target for cancer chemotherapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45:1212–1216.
- Bae, K., Shim, H., Balu, D., Kim, S., and Yu, S. (2014). Translocator protein 18 kda negatively regulates inflammation in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol.*, 9(3):424–37.
- Costa, B., Bendinelli, S., Gabelloni, P., Da Pozzo, E., Daniele, S., Scatena, F., Vanacore, R., P, C., Bertamino, A., Gomez-Monterrey, I., Sorriento, D., Del Giudice, C., Iaccarino, G., Novellino, E., and Martini, C. (2013). Human glioblastoma multiforme: p53 reactivation by a novel mdm2 inhibitor. *PLoS ONE*, 8(8):e72281.
- Da Pozzo, E., Costa, B., and Martini, C. (2012). Translocator protein (tspo) and neurosteroids: implications in psychiatric disorders. *Curr Mol Med.*, 12:426–442.
- Da Settimo, F., Simorini, F., Taliani, S., La Motta, C., Marini, A. M., Salerno, S., Bellandi, M., Novellino, E., Greco, G., Cosimelli, B., Da Pozzo, E., Costa, B., Simola, N., Morelli, M., and Martini, C. (2008). Anxiolytic-like effects of n,n-dialkyl-2-phenylindol-3-ylglyoxylamides by modulation of translocator protein promoting neurosteroid biosynthesis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(18):5798–5806. PMID: 18729350.

- Dai, M. S., Challagundla, K. B., Sun, X. X., Palam, L. R., Zeng, S. X., Wek, R. C., and Lu, H. (2012). Physical and functional interaction between ribosomal protein l11 and the tumor suppressor arf. *Journal of Biological Chemistry*, 287(21):17120–17129.
- Davies, L., Spiller, D., White, M., Grierson, I., and Paraoan, L. (2011). Perp expression stabilizes active p53 via modulation of p53-mdm2 interaction in uveal melanoma cells. *Cell Death and Dis.*, 2:e136.
- England, B., Huang, T., and Karsy, M. (2013). Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumor Biology*, 34(4):2063–2074.
- Furnari, F., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., and Stegh, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21):2683–2710.
- Gatliff, J. & Campanella, M. (2012). The 18 kda translocator protein (tspo): a new perspective in mitochondrial biology. *Curr Mol Med*, 12:356–368.
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szab , I., Lippe, G., and Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial atp synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15):5887–5892.
- Johannessen, Tor-Christian Aase & Bjerkvig, R. (2012). Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(5):635–642.
- Kalman, B., Szep, E., and Garzuly, F. (2013). Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma. *NeuroMolecular Medicine*, 15(2):420–434.
- Kreisl, W. C., Lyoo, C. H., McGwier, M., Snow, J., Jenko, K. J., Kimura, N., Corona, W., Morse, C. L., Zoghbi, S. S., Pike, V. W., McMahon, F. J., Turner, R. S., Innis, R. B., and the Biomarkers Consortium PET Radioligand Project Team (2013). In vivo radioligand binding to translocator protein correlates with severity of alzheimer’s disease. *Brain*, 136(7):2228–2238.



- Liang, S.-H. and Clarke, M. (2001). Regulation of p53 localization. *Eur. J. Biochem.*, 268:2779–2783.
- Ma, B. and Nussinov, R. (2007). Trp/met/phe hot spots in protein-protein interactions: potential targets in drug design. *Curr Top Med Chem.*, 7(10):999–1005.
- Masui, K., Cloughesy, T., and Mischel, P. (2012). Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 38(3):271–291.
- Miller, W. L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1-2):62 – 73. Mitochondrial endocrinology ?fï Mitochondria as key to hormones and metabolism.
- Oh, T., Ivan, M. E., Sun, M. Z., Safaei, M., and others. (2014). Pi3k pathway inhibitors: potential prospects as adjuncts to vaccine immunotherapy for glioblastoma. *Immunotherapy*, 6(6):737–753.
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapere, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M. D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R., and Gavish, M. (2006). Translocator protein (18kda): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8):402–409.
- Popowicz, G. M., Domling, A., and Holak, T. A. (2011). The structure-based design of mdm2/mdmx-p53 inhibitors gets serious. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(12):2680–2688.
- Rechichi, M., Salvetti, A., Chelli, B., Costa, B., Da Pozzo, E., Spinetti, F., Lena, A., Evangelista, M., Rainaldi, G., Martini, C., Gremigni, V., and Rossi, L. (2008). Tspo over-expression increases motility, transmigration and proliferation properties of c6 rat glioma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(2):118 – 125.

- Romanov, V., Pospelov, V., and Pospelova, T. (2012). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21-waf1: Contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 77(6):575–584.
- Rosenberg, N., Rosenberg, O., Weizman, A., Veenman, L., and Gavish, M. (2013). In vitro catabolic effect of protoporphyrin ix in human osteoblast-like cells: possible role of the 18 kda mitochondrial translocator protein. *J Bioenerg Biomembr.*, 45(4):333–41.
- Sami, A. and Karsy, M. (2013). Targeting the pi3k/akt/mtor signaling pathway in glioblastoma: novel therapeutic agents and advances in understanding. *Tumor Biology*, 34(4):1991–2002.
- Trapani, A., Palazzo, C., DeCandia, M., Lasorsa, F., and Trapani, G. (2013). Targeting of the translocator protein 18 kda (tspo): A valuable approach for nuclear and optical imaging of activated microglia. *Bioconjugate Chemistry*, 24(9):1415–1428.
- Van Meir, E., Costas, G., Norden, A. D., Hui-Kuo, S., Wen, P., and Olson, J. J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology. the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.*, 60(3):166–193.
- Vassilev, L. T. (2007). Mdm2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 13(1):23–31.
- Vassilev, L. T., Graves, B., Thompson, T., Xia, M., Janson, C., Lukacs, C., Deo, D., Di Lello, P., Fry, D., Garvie, C., Huang, K.-S., Gao, L., Tovar, C., Lovey, A., and Wanner, J. (2012). Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced mdm2 and mdmx dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29):11788–11793.
- Veenman, L & Gavish, M. (2012). The role of 18 kda mitochondrial translocator protein (tspo) in programmed cell death, and effects of steroids on tspo expression. *Curr Mol Med.*, 12:398–412.
- Vousden, K. H. and Ryan, K. M. (2009). p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, 9(10):691–700.

- Zappelli, E., Daniele, S., Abbracchio, M. P., Martini, C., and Trincavelli, M. L. (2014). A rapid and efficient immunoenzymatic assay to detect receptor protein interactions: G protein-coupled receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4):6252–6264.
- Zuckerman, V., Wolyniec, K., Sionov, R. V., Haupt, S., and Haupt, Y. (2009). Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *The Journal of Pathology*, 219(1):3–15.